

GERGELY CSILLA

**TÖLTÉSMOZGÁSOK ÉS FOTOCIKLUS
A VAD TÍPUSÚ
ÉS MUTÁNS BAKTERIORODOPSZINBAN**

Doktori (PhD) értekezés

*témavezető: Váró György
a fizikai tudomány doktora*



MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizika Intézet

1996

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A bakteriorodopszin	6
2.1.1. A bíbormembrán szerkezete.....	6
2.1.2. Az opszin és a kromofór szerkezete	7
2.1.3. A sötét- és a fényadaptált bakteriorodopszin	12
2.2. A bakteriorodopszin fotociklusa	13
2.2.1. A fotociklus kinetikai modellezése	13
2.2.2. A J és a K forma	17
2.2.3. Az L forma	19
2.2.4. Az M forma	20
2.2.5. Az N forma	24
2.2.6. Az O forma és a kezdeti állapot visszaalakulása	26
2.3. A protontranszport mechanizmusa	29
2.4. A protontranszport vizsgálata bakteriorodopszin mutánsok segítségével	34
2.4.1. Mutációk az extracelluláris proton leadás tartományában	35
2.4.2. Mutációk a retinál körül	37
2.4.3. Mutációk a citoplazmatikus proton felvétel tartományában	38
2.5. A fehérje elektromos válaszjelének elmélete	41
3. CÉLKITŰZÉS	46
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	48
4.1. Mintakészítés	48

4.2. Mérési módszerek	50
4.2.1. Abszorpciókinetikai és fotoelektromos mérések	50
4.2.2. Optikai sokcsatornás analizátorral végzett mérések	52
4.3. Mérési adatok kiértékelése	55
5. EREDMÉNYEK ÉS EZEK ÉRTELMEZÉSE	60
5.1. A 13 – <i>cisz</i> bakteriorodopszin fotociklusa	60
5.1.1. A 13 – <i>cisz</i> bakteriorodopszin OSMA differencia spektrumai ...	60
5.1.2. A 13 – <i>cisz</i> fotociklus kinetikája 610 nm -en	64
5.1.3. A 13 – <i>cisz</i> fotociklus fotoelektromos jelei	67
5.1.4. Az eredmények értelmezése: a 13 – <i>cisz</i> bakteriorodopszin fotociklusa	69
5.2. Töltésmozgások a <i>D85N</i> és <i>D212N</i> bakteriorodopszin mutánsokban ..	74
5.2.1. A <i>D85N</i> és <i>D212N</i> mutánsok abszorpciókinetikai jelei	74
5.2.2. A <i>D85N</i> és <i>D212N</i> mutánsok fotoelektromos jelei	79
5.2.3. Az eredmények értelmezése: töltésmozgások a <i>D85N</i> és <i>D212N</i> mutánsokban	81
5.3. Töltésmozgások a <i>D96N</i> bakteriorodopszin mutánsban	84
5.3.1. A <i>D96N</i> mutáns abszorpciókinetikai jelei	84
5.3.2. A <i>D96N</i> mutáns fotoelektromos jelei	89
5.3.3. Az eredmények értelmezése: töltésmozgások a <i>D96N</i> mutánsban	91
6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	94
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
ANGOL NYELVÜ ÖSSZEFOGLALÓ	98
8. IRODALOM	104

1. BEVEZETÉS

A sejtek a biológiai rendszerek alapegységeiként környezetükből energiát vesznek fel és azt biológiailag hasznosítható szabadenergiává alakítják át. Az energia termelői és annak felhasználói egymástól elkülönített fehérje komplexek, melyeknek kapcsolata számos kutatás tárgyát képezte. Az energiaátalakító folyamatok csaknem mindig valamilyen membránhoz kötötten zajlanak és a ma már elfogadott Mitchell-féle kemiozmotikus elmélet [1] szerint a mitokondriumok, a kloroplasztiszok és a baktériumok elektrontranszportláncait az ATP szintézishez a proton elektrokémiai potenciálja kapcsolja. Az ATP szintézist és az elektrontranszportot reverzibilisen működő protonpumpák hajtják. Így például a mitokondriumban lejátszódó oxidatív foszforilációban a tápanyag elégetésekor keletkezett energiával működő protonpumpák protonkoncentráció különbséget hoznak létre a membrán két oldala között, amely aztán az ATP-szintetáz enzimeken keresztül egyenlítődik ki az ADP és inorganikus foszfátból való ATP szintetizálása során. A felvett energia tehát az ATP nagyenergiájú foszfát kötésében tárolódik. Az energiaháztartás egyes molekuláris részfolyamatainak pontos mechanizmusa még mindig nem ismert, ezért a transzportfehérjék működésének részletes feltárása bioenergetikai szempontból nagy fontossággal bír.

A különböző sejtekben levő ionpumpák változatos módon hozzák létre a proton elektrokémiai potenciálját. Az eddig legegyszerűbbnek tartott energia-átalakító mechanizmussal rendelkezik a *Halobacterium salinarium* sejtmembránjában található fehérjefesték komplex, a bakteriorodopszin (*bR*) [2]. A *bR* által elnyelt fény hatására a retinál izomerizálódik és a fehérje a kromofór környezetében bekövetkezett pK_a változásokon keresztül megvalósítja a membrán két oldala között a protonkoncentráció-különbséget. A protonok az ATP-szintetázon keresztül visszaáramlanak a sejtbe, miközben ATP keletkezik. Mivel itt egyetlen molekula végzi a protontranszportot, valószínűleg ebben a rendszerben a legegyszerűbb a pumpálás törvényszerűségeit vizsgálni. Ily módon a *bR* transzportfolyamatainak molekuláris szintű megismerése példa értékű lehet más ionpumpák működésének megértésében is.

Ennek a kis molekulasúlyú (26 kDa), aránylag egyszerű membránfehérjének jól ismert az elsődleges szerkezete, mitöbb háromdimenziós elektronsűrűségi térképből származó szerkezeti modellünk is van róla. Mindazonáltal működésének molekuláris lépéseiről még mindig nincs pontos képünk. A dolgozatban ismertetett kísérletek eredményei a bakteriorodopszin protontranszportjával kapcsolatos folyamatok jobb megértéséhez vezettek.

A bakteriorodopszinon végzett kutatások jelentős része a fény által, a molekulában elindított reakciók sorát próbálja feltérképezni. Megvilágítás hiányában, a fehérje sötétadaptált állapotban van: a retinál *all* – *transz* és 13 – *cisz* izomér formák keverékeként van jelen. A csak 13 – *cisz* retinált tartalmazó *bR* fotociklusáról még keveset tudunk, akárcsak a fényadaptáció folyamatáról. Munkánkban spektroszkópiai és elektromos módszerekkel vizsgáltuk a sötétadaptált *bR* -t, meghatároztuk a 13 – *cisz* fehérje köztes állapotait és az átmeneteket kísérő töltésmozgásokat. Az eredmények modellezése pedig lehetővé tette a fényadaptáció folyamatának "azonosítását" a reakciósorban.

A fényadaptált (csak *all* – *transz* retinált tartalmazó) fehérje által megvalósított protontranszlokáció bizonyos molekuláris lépéseinek megértéséhez vezettek a *bR* pontmutánsokon végzett optikai és fotoelektromos kísérleteink. Ezek a mérések ugyanakkor, hasznos adatokat szolgáltatottak egyes aminosavaknak a protontranszportban játszott szerepére vonatkozóan.



2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A BAKTERIORODOPSZIN

2.1.1. A bíbormembrán szerkezete

A bakteriorodopszin molekulák a *Halobacterium salinarium* sejtmembránjában elkülönülve, koncentráltan helyezkednek el, a színükről elnevezett bíbor membrán fragmentumokban (*bm*). Ezek elektronsűrűségi képe az 1. ábrán látható [3].



1. ábra. A bíbormembrán elektrondiffrakciós vizsgálatokból származó képe a membrán normálisának irányából nézve ([3] alapján). A szaggatott vonal egy bakteriorodopszin molekulát határol. A folytonos vonal a hexagonális rács elemi celláját jelöli.

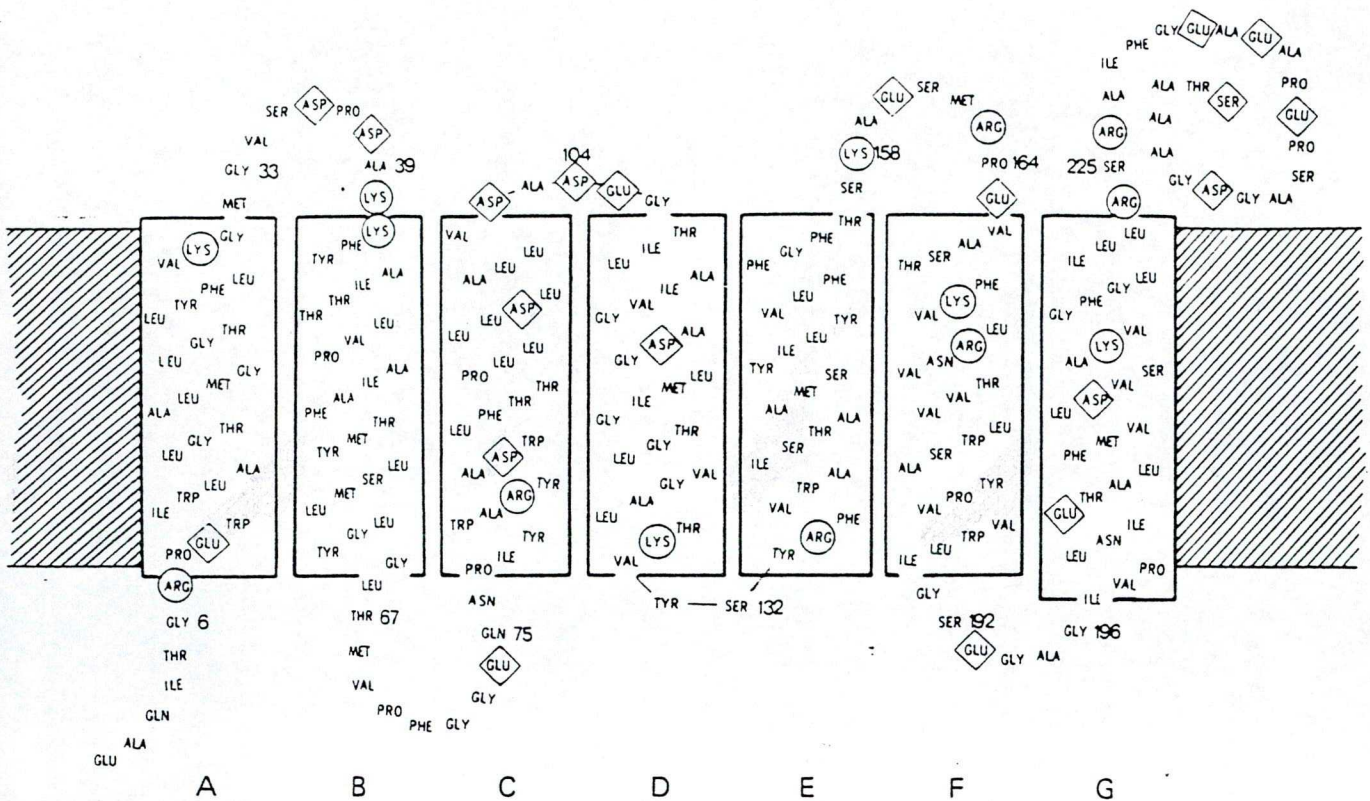
A *bR* molekulák e membránokban rögzítetten, kétdimenziós hexagonális kristályrácsot alkotva helyezkednek el, úgy hogy a trimerekké összeállt molekulák a rácspontokban találhatóak. A *bm*-ok átlagos átmérője $0.5 \mu m$, vastagsága $4.9 nm$ [4]. A 75%-ban csak *bR* fehérjét és 25% lipidet tartalmazó *bm*-ek aránylag könnyen izolálhatók és mind strukturálisan, mind funkcionálisan hosszú ideig stabilak maradnak [5]. Az izolált *bm*-ek korong alakúak és nagy fehérjetartalmuk miatt eléggé merevek ahhoz, hogy oldatban is nyitottak maradjanak.

A *bm*-et alkotó lipidek többsége töltött vagy poláros és mint a legtöbb sejtmembránban, a glikolipidek a külső rétegben helyezkednek el [6]. A lipidek valamint a fehérje felületi töltéseinek eredményeképpen a *bm* jelentős negatív felületi töltéssel rendelkezik. Annak ellenére, hogy ezt kis mértékben a membránhoz kapcsolódó kationok csökkentik, a töltöttség magas felületi potenciált eredményez, főként alacsony sókoncentrációnál. Ez a felületi potenciál határozza meg a lokális protonkoncentrációt, tehát a fehérje ionizálható oldalláncainak protonáltsági állapotát. Ezért a felületi pH nagy mértékben függ az oldat sókoncentrációjától [7].

2.1.2. Az opszin és a kromofór szerkezete

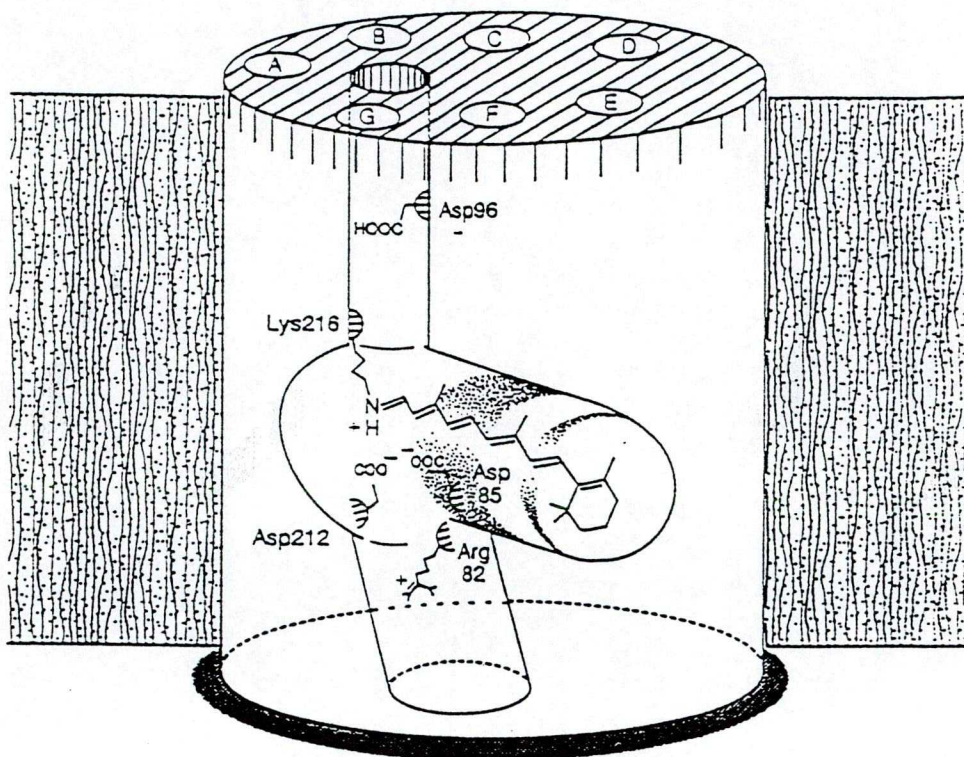
A *bR* azon membrán-fehérjék közé tartozik, amelyeknek elsőként határozták meg az aminosav szekvenciáját és amiről meglehetősen jó háromdimenziós szerkezeti képpel rendelkezünk.

A *bR* egy apoproteinből, az ún. opszinből, és az ebbe ágyazódó retinál kromofórból áll. A fehérje 248 aminosavból épül fel, ennek elsődleges szerkezete a 2. ábrán látható [8,9].



2. ábra. A bakteriorodopszin aminosav szekvenciája ([9] alapján). Az extraceluláris oldal az ábra alján van; a körök a pozitívan, a rombuszok a negatívan töltött csoportokat jelzik.

Krio-elektronmikroszkópiai módszerekkel meg lehetett határozni a *bR* háromdimenziós elektronsűrűségi térképét: 1.0 nm valamint 0.35 nm feloldással a membránra merőleges, illetve azzal párhuzamos síkban [10,11]. A 3. ábrán a háromdimenziós szerkezet egyszerűsített modellje látható. A fehérje hét, a membránon átnyúló és rá majdnem merőleges α -hélixbe rendeződik, amelyek elég jól megkülönböztethetőek a *bm* elektronsűrűségi képén (1. ábra).



3. ábra. A bakteriorodopszin háromdimenziós szerkezetének egyszerűsített modellje ([11] alapján). Az extracelluláris oldal az ábra alján van.

Az A-G betűkkel jelölt, hét hélix csatornát képez a membránon keresztül, amelyben a fehérje kromofórja, a retinál található a *bm* normálisának irányából nézve a molekula közepén [12]. A retinál a membrán intracelluláris oldalához közelebb eső, a G helixen levő *Lys* – 216 fehérje oldallánchoz kovalensen kapcsolódik egy C=N kötésen, a Schiff-bázison keresztül [8,13].

A csatorna extracelluláris része hidrofil és sokkal szélesebb mint a retinál és a citoplazma közötti hidrofób oldala [11]. Henderson és munkatársai által kidolgozott háromdimenziós szerkezet megadja a fehérje oldalláncok helyzetét egy aminosav pon-

tossággal. A 3. ábrán feltüntetett aminosavak: az *Asp*-85, *Asp*-96, *Asp*-212, *Arg*-82 csak néhány azok közül amelyek a kromofór beágyazódási üregét alkotják és amelyek nagyon fontos szerepet töltenek be a protontranszlokációban.

A retinál helyzetéről a fehérjében neutron-diffrakciós és lineáris dikroizmus mérések szolgáltatottak pontos adatokat. Ezek a kísérletek kimutatták, hogy a kromofór átmeneti dipólusmomentuma, melynek iránya a retinál polién láncával közel azonos, a membrán síkjával 20° -os szöget zár be [14,15] míg a kromofór síkja merőlegesen áll a *bm* síkjához képest [16]. A Schiff-bázis nitrogénje félúton a C és G hélixek között, a ciklohexán gyűrű pedig az E hélixhez közel fekszik [17]. A Schiff bázis 1.6 nm , a jonon gyűrű 0.9 nm távolságra van az extracelluláris oldaltól [18].

A Schiff-bázis nitrogénje reverzibilisen protont tud megkötni [13]. Egy poláros oldószerben levő protonált Schiff-bázis abszorpciós maximuma 440 nm körül van. Ezen érték és a fényadaptált bakteriorodopszin 568 nm -es abszorpciós maximuma közötti különbséget opszin eltolódásnak nevezzük és a fehérje által, a retinál környezetében okozott változásoknak köszönhető.

Az egyik tényező ami ehhez az opszin eltolódáshoz hozzájárul, az a Schiff bázis és a közelében levő negatív ellenion közötti kölcsönhatás: egy gyenge hidrogén kötés, mely hosszabb hullámhosszak felé tolja az abszorpciós maximumot [19,20,21]. *bR* pontmutációkon végzett tanulmányok [22,23,24] határozták meg az elleniont képező lehetséges aminosavakat. A deprotonált állapotban levő *Asp* - 85 és *Asp* - 212 aminosavak meglehetősen közel, 4 \AA távolságra vannak a Schiff-bázistól. Mindkettő alapvető fontosságú ahhoz, hogy a fehérje megvalósítsa a protontranszportot [22,G1,G2,G3]. Az *Asp* - 85 kicserélése semleges aszparaginra az abszorpciós maximum vöröseltolódását eredményezte, egy negatív töltés elvesztésének megfelelően. A Schiff-bázis és ellenionja közötti gyenge hidrogénkötés arra utal, hogy a Schiff-bázis nem csak egy aminosavval áll kölcsönhatásban, hanem egy töltéskomplexxel [25]. A felsorolt aszpartátok együtt az *Arg* - 82, *Tyr* - 57, *Tyr* - 185 csoportokkal az ellenion részét

alkothatják [25]. A hidrogénkötésben résztvevő csoportok közé néhány vízmolekula is beépül [26]. Újabb mérések szerint, nagy valószínűséggel a pozitívan töltött Schiff-bázis és *Arg* – 82, valamint a negatívan töltött *Asp* – 85 és *Asp* – 212 nulla nettó töltésű quadrupólust alkotnak [27].

A fehérjébe való bekötődésekor a retinál *s* – *transz* izomér formába alakul át a $C_6 - C_7$ kötés mentén, és ez is hozzájárul az opszin-eltolódáshoz [28].

Valószínűleg a kromofór jonon gyűrűjének közelében levő dipólus is hozzájárul az abszorpciós maximum vöröseltolódásához [29]. A dipólus alkotói lehetnek a *Trp* – 138, *Pro* – 186 valamint az *Asp* – 115 protonált karboxil csoportja [30].

A Schiff-bázis körüli elektrosztatikus kölcsönhatások mellett, sztérikus kölcsönhatások stabilizálják a retinál helyzetét a fehérjében. A kromofór polién láncát a *Pro* – 186 valamint a *Trp* – 86, 182 és 189 aromás aminosavak megfelelő pozícióban tartják [11,31,32]. Míg a *Trp* – 189 és *Pro* – 186 a jonon gyűrű mozgását korlátozzák, a *Trp* – 182 és *Trp* – 86 a polién lánc elmozdulását akadályozzák meg a membrán normálisának irányában. Ezen triptofán csoportok bármelyikének helyettesítése más aminosavakkal az abszorpciós spektrum eltolódását, a protontranszport sebességének csökkenését és a fehérjeszerkezet instabilitását eredményezte [33].

A fentebb felsorolt aminosavak egy üreget határolnak be, amelyben a kromofór helyezkedik el jól meghatározott kötési lehetőségekkel és fotokémiai tulajdonságokkal. Annak ellenére, hogy a Schiff-bázis kötőhelye meglehetősen zártnak mutatkozik kis hidrofil molekulák részére, a protont könnyen magához köti [34].

A protontranszport szempontjából a *bR* három fontos funkcionális egységre osztható: a kezdeti állapotban protonált Schiff-bázis, a retinál és citoplazma közötti, protonfelvételt végző hidrofób része a csatornának, valamint a kromofórtól a sejt-kívüli tartomány felé eső hidrofil protonleadó rész.

2.1.3. A sötét- és a fényadaptált bakteriorodopszin

A retinál a bakteriorodopszinban kétféle izomér állapotban fordul elő: a 13 – *cisz* és *all* – *transz* formákban [35]. Hosszas sötétben állás után a *bR* sötétadaptált állapotban van, amelyben a 13–*cisz*, 15–*syn* és az *all*–*transz*, 15–*anti* (továbbiakban röviden 13 – *cisz* illetve *all* – *transz*) izomérek aránya 2:1 [36], mások szerint 3:2 [37], de ezt az arányt mind a fehérje, mind a kromofór változásai könnyen módosíthatják [21,38]. Hosszas megvilágítás hatására kialakul az ún. fényadaptált *bR*, amelyben a kromofór teljes egészében *all* – *transz* állapotba kerül. Alacsony fényintenzitásoknál a fényadaptáció 0.035 látszólagos kvantumhatásfokkal megy végbe [39], de ez az érték jelentősen nőhet a fényerővel [40,G4]. A sötétadaptáció termikus relaxáció során megy végbe körülbelül félórás időállandóval, szobahőmérsékleten, pH 7-en [41,42,43]. A retinál izomerizációjában nagy szerepe van a fehérjének, a kromofórt körülvevő oldalláncoknak, így például az *Arg* – 82 kicserélése alaninra jelentősen megváltoztatta a sötétadaptáció időállandóját [44]. Általánosan elfogadott az a tény, hogy csak az a bakteriorodopszin pumpál protont fény hatására amelyben a retinál *all* – *transz* állapotban van [45], habár pH 7 fölött protontranszportot észleltek a 13 – *cisz* konfigurációjú retinált tartalmazó *bR*-ben is [46,47].

2.2. A BAKTERIORODOPSZIN FOTOCIKLUSA

Fénnyel való gerjesztés során a bakteriorodopszin egy fotociklusnak nevezett reakciósoron megy át [48]. A fénykvantum elnyelése magasabb energiájú állapotba juttatja a molekulát, majd ezt az energiát a fotociklus termikus reakciói során több lépésben elveszítve, a fehérje visszatér alapállapotába. A foton elnyelését követően 0.5 ps idő alatt, a retinál gerjesztett állapotán keresztül kialakul a molekula első metastabil, nagy energiájú állapota. Szobahőmérsékleten és pH 7-en a ciklus 5 – 10 ms alatt ér véget. Az egyes lépések során különböző hullámhosszknál abszorbeáló formák, úgynevezett intermedierek alakulnak ki, melyeket *J*, *K*, *L*, *M*, *N*, *O* betűkkel jelölnek, gyakran az abszorpciós maximumot is feltüntetve alsó indexben. Ezen reakciósor alatt a kromofór által elnyelt fény energiája átadódik a fehérjének, amely aztán konformációs változások során megvalósítja a protontranszportot [48,49].

A molekula gerjesztése után kialakuló köztes formákat a látható tartománybeli abszorpciós spektrumaik alapján értelmezték. Az eltérő spektrumok a kromofór és az őt körülvevő fehérje változásaira utalnak. A retinál izomerizációs változásait a fotociklus során, elsősorban Raman spektroszkópiai módszerekkel lehet követni. A retinál izomerizációja után, az opszinban lejátszódó konformációs változásokról, a fehérje oldalláncainak protonáltsági állapotáról pedig főként az UV-abszorpciós és IR-vibrációs spektroszkópia ad számot.

2.2.1. A fotociklus kinetikai modellezése

Különböző spektroszkópiai módszerek, mint a flash-fotolízis és az alacsony hőmérsékleti spektroszkópia lehetővé tették a fotociklus modellezését. A legegyszerűbb modell a $BR \rightarrow J \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow BR$, ahol a *BR* az alapállapotban levő molekulát jelöli. Ez a, már 1975-ben Lozier és munkatársai [48] által meghatározott egyszerű séma, mely a fényadaptált *bR* molekula fotocik-

lusára vonatkozik, meglehetősen jónak bizonyult a semleges pH-jú, vizes szuszpenzióban levő *bR* működésének leírására. Mindazonáltal, a fotociklus időállandóinak függése a környezet pH-jától, ionerősségétől és ionösszetételétől, akárcsak az észlelt jelenségek változása a fényerőséggel, szükségessé tették a modell pontosítását. Mivel a fotociklus lépései minden bizonnyal jól meghatározott molekuláris történésekhez tartoznak, a reakciósor átmeneteinek és azok energetikájának pontos leírása a protontranszport molekuláris mechanizmusának megértéséhez vezet.

Általánosan elfogadott fotociklus modellről még nem beszélhetünk, főként a köztes állapotok látható tartománybeli spektrumainak átfedése miatt. Ennek ellenére, a mérési technikák tökéletesítése, és a jel/zaj viszony fokozatos javítása alapot szolgáltatott bizonyos kiegészítő megállapítások megtételére, úgymint:

- az intermedierek közötti átmenetek többnyire reverzibilisek
- létezhetnek olyan gyors átmenetek amelyeket az eddigi mérések nem "láttak", illetve spektrálisan azonos, de kinetikailag elkülöníthető formák bevezetése is szükséges lehet
- a fotociklus egyes köztes állapotaiból elágazások jelenhetnek meg
- a *bR* molekulának lehetnek pH függő formái, különböző időállandókkal rendelkező fotociklusokkal.

Arra, hogy miként lehet egy aránylag jól meghatározott reakciósorral modellezni a *bR* fotociklusát látható- és infravörös spektroszkópiái illetve fotoelektromos mérésekből, különböző kutatócsoportok kritériumokat dolgoztak ki [50,51,52,53,54,55,56]. A fehérjében, a fény által okozott, abszorpcióváltozások meghatározása mérés technikailag jól kidolgozott. Azonban, az abszorpcióváltozás átszámolása a megjelenő formák koncentrációjának időfüggésévé nem egyszerű feladat. Tulajdonítható ez elsősorban annak, hogy a kialakuló köztes állapotok spektrumai csak közelítőleg meghatározottak, következésképpen az időfüggések pusztán csak matematikai módszerekkel nem állapíthatók meg. A feladat megoldásának érdekében különböző kiegészítő feltételezéseket kellett bevezetni, mint például:

- az átmenetek sebességállandóinak hőmérsékletfüggése az Arrhenius törvényt követi [57,58]

- a számolt spektrumok (a köztes állapotoké) némelyike elvethető, főként formabeli megfontolások alapján: az abszorpció nem lehet negatív, a spektrumok alakja az alapállapotban levő bakteriorodopszinéhoz hasonló kell legyen [57,59]

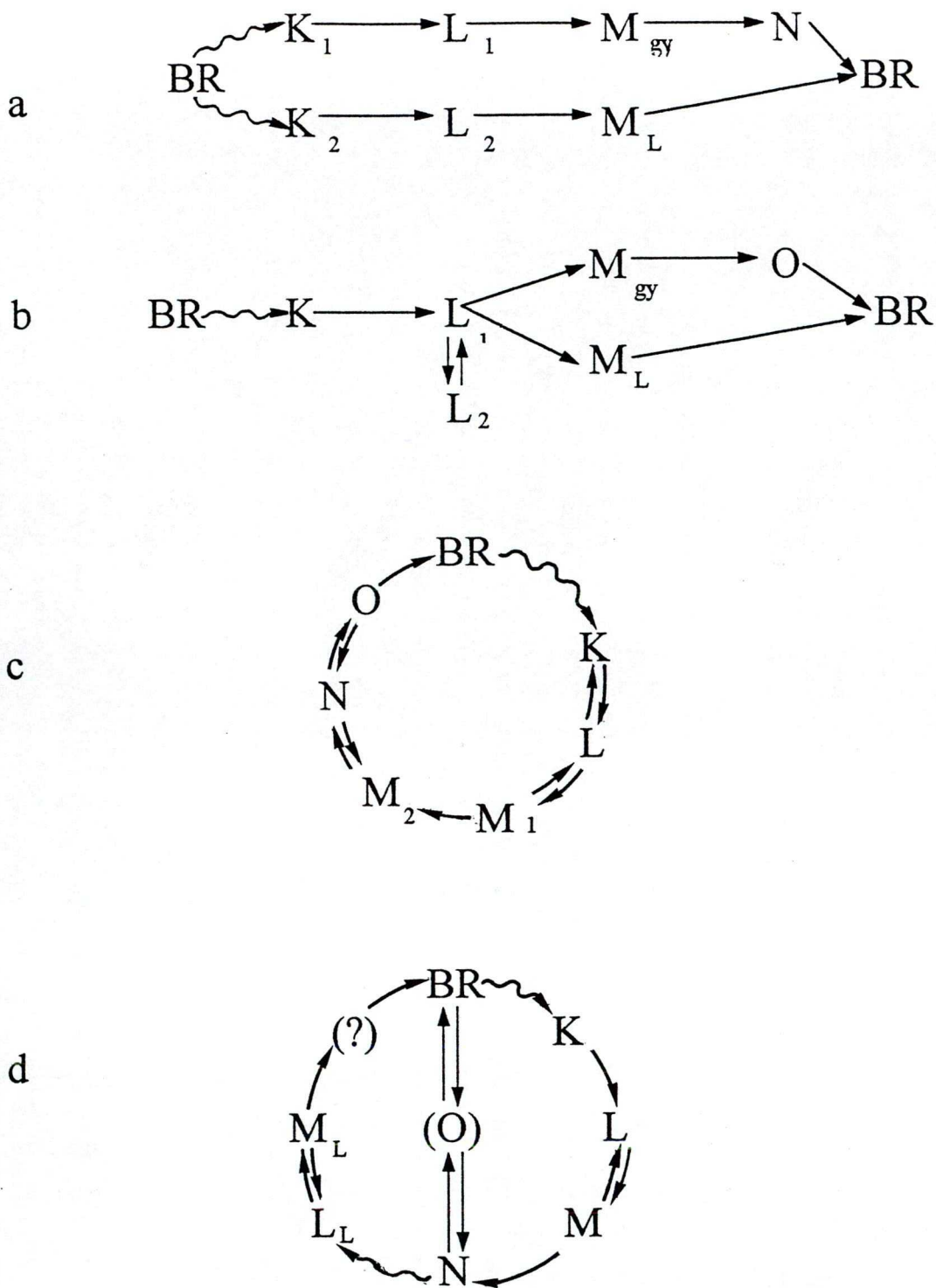
- a bR mutációi változatlanul hagyják a modell "gerincét", így tanulmányozásuk megoldásokat nyújt a kinetika egyes részeire [60,61]

- egyes modellek előnyben részesíthetők másokkal szemben, "fizikai" értelmezésüknek köszönhetően [62].

Ezek a feltételezések különféle fotociklus modelleket eredményeztek. A bakteriorodopszinon végzett mérésekből származó spektrális adatok komplexitása azonban lehetővé teszi a különböző modellekkel történő, közel azonos minőségű illesztésüket [58,63,64,G5]. A mérések jel/zaj viszonya általában nem elegendő ahhoz, hogy valamely modell mellett dönteni lehessen. A helyzetet tovább bonyolítja az a tény is, hogy azonos számú szabad paramétert tartalmazó különböző modellek egyformán illeszthetők az adatokra.

Az első, egyszerű fotociklus modell módosítását szükségessé tette az a megfigyelés is, hogy egyes köztes állapotok kialakulása és lecsengése többfázisú. Az új adatok nem értelmezhetők az egyirányú reakciókat tartalmazó modell alapján [65], de több olyan bonyolultabb fotociklus modell létezik amely a többfázisú időállandókra próbál magyarázatot adni. Ezek közé tartozik:

- (A) az a modell amely párhuzamos fotociklusokat tételez fel a bR preparátum valószínű heterogenitásából eredően [66,67,68,69]
- (B) az elágazásokat tartalmazó fotociklus modell [69,70]
- (C) egyetlen elágazásmentes fotociklust feltételező modell, amelynek átmeneteit többnyire reverzibilis reakciók képezik [55,57,71,72,73,59]
- (D) kétfotonos ciklus, amelyben az M forma lassú lecsengése az őt követő N állapot fotoreakciójának a következménye [74].



4. ábra. Bakteriorodopszin fotociklus modellek. A J formát nem tüntettük fel a sémákban. A hullámos vonalú nyilak fény által hajtott reakciókat jeleznek. A különböző alállapotok jelöléseiben megjelenik a gyors (gy) illetve lassú (l) lecsengésű komponens.

Az említett fotociklus modellek sémái a 4. ábrán láthatók. A különböző fotociklus modellek bemutatására részletesebben ki fogunk térni a későbbiekben, egyes átmenetek tárgyalásakor.

Az időfelbontásos FTIR mérések eredményei [55,75], a Raman rezonancia spektrumok [71], valamint a látható tartománybeli spektroszkópiai kísérletekből származtatott kinetika [57,73,59,76] alapján a *bR* fotociklusa jól leírható a szekvenciális, reverzibilis reakciókat tartalmazó, $BR \rightarrow J \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow M1 \rightarrow M2 \leftrightarrow N \leftrightarrow O \rightarrow BR$ (4C. ábra) modellel. Ennek a modellnek az alapján született meg a fotociklus első teljes termodinamikai tárgyalása. A sebességi állandók hőmérsékletfüggéséből ki lehetett számolni az egyes reakciók aktiválási entrópiáját és entalpiáját [57].

Amint azt a továbbiakban látni fogjuk egyes formáknak alállapotai is lehetnek: kinetikai megfontolások az elsővel csaknem azonos abszorpciós spektrummal rendelkező második *L*, *M*, *N*, *O* formák beillesztését teszik szükségessé [60,62,73,G6]. Az alapállapotban levő *BR*, akárcsak a köztes állapotok, széles, aszimmetrikus abszorpciós sávval rendelkezik a látható tartományban. A következő paragrafusokban a fotociklus intermedierjeinek spektrális jellemzőiről, valamint az egyes átmeneteket kísérő, az op-szinban és a retinálban lejátszódó változásokról lesz szó.

2.2.2. A *J* és a *K* forma

A kromofór által elnyelt foton gerjeszti a molekulát és a BR_{568} 0.5 ps alatt új, 600 nm körül abszorbeáló, *J* formába megy át, amelyből aztán 4 ps alatt alakul ki a *K* állapot [77,78,79,80]. A *J* formáról meglehetősen keveset tudunk, mindazonáltal nagyon valószínű, hogy az 1518 cm^{-1} vibráció ami rögtön a gerjesztés után felvett Raman spektrumban megjelenik nem más, mint a *J* állapot C=C kettőskötés vibrációja [80,81]. A $J \rightarrow K$ átmenet nem lassítható le a hőmérséklet 10 K -ig történő csökkentésével sem, ezért a *J* forma nem tanulmányozható alacsony hőmérsékleti spektroszkópiával.

A K forma sokkal jobban ismert, elsősorban azért, mert a fotociklus befagyasztható ezen a ponton. A $BR \rightarrow K$ átmenet jól tanulmányozható optikai módszerekkel és rövid, 4 ps-os időállandója ellenére, a vibrációs spektroszkópia illetve a fotoelektromos mérések is eredményeseknek bizonyultak [80,81,82]. A K intermedier kialakulásának kvantumhatásfoka 0.64 és ez az érték hőmérséklet-, valamint pH 5 és 10.5 között, pH függetlennek bizonyult [83]. A K_{590} formát fényvel gerjesztve, az visszaalakul a kiindulási, BR_{568} állapotba [84].

A vibrációs spektroszkópia eredményei szerint a retinál konformációja különbözik a J illetve K formákban. A K állapot kialakulásáig egy fotoizomerizáció játszódik le, amelynek során a kromofór $all - transz \rightarrow 13 - cisz$ konformációváltás zajlik le [85,86]. Ha felvesszük a fotociklus köztes állapotainak közeli ultraibolya tartománybeli spektrumait, többségükben egy 335 nm körüli abszorpciós sáv jelenik meg, az úgynevezett " $cisz -csúcs$ ", amely a kromofór $13 - cisz$ formájára utal [87]. A csúcs intenzitása alig változik a $BR \rightarrow K$ átmenet során. A kromofór K -beli $13 - cisz$ konformációja különbözik a relaxált $13 - cisz$ konformációtól [88]. A retinál izomer formája a K -ban szterikus feszültségek következtében csavart, torzult [89,90].

A fotoelektromos kísérletekből kapott elektromos jelek előjele arra utal, hogy ha pozitív töltés mozgását feltételezzük, akkor az első lépésekben ez azzal az iránnyal ellentétesen mozog, amely felé a fotociklus későbbi részében a proton leadása történik [91,92]. A mért jelet a kromofór izomerizációjának és az azt követő mozgásának tulajdonították.

Az, hogy miként tárolódik a K formában a bR molekula által elnyelt foton energiája még mindig nem tisztázott, habár léteznek már számolásokkal alátámasztott elképzelések erről a mechanizmusról. Egyesek szerint az izomerizáció során a protonált Schiff-bázis és negatív ellenionja elszakadnak egymástól. Az így kialakuló K állapotban elektrosztatikus energia formájában tárolódik tehát a fényenergia [85]. Ezt az elméletet támasztja alá a K forma abszorpciós spektrumának vöröseltolódása is, ami

a π elektronok delokalizációjának következményeként, megfelel a protonált Schiff-bázis és ellenionja közti távolság növekedésének [85]. Más elméletek a kromofór deformált, csavart állapotát tartják kulcsfontosságúnak az energiatárolás szempontjából [93].

2.2.3. Az L forma

A K köztestermék nem stabil, élettartama $2 \mu s$ körül van (szobahőmérsékleten és pH 7-en) és termikus reakcióval az 550 nm -nél abszorbeáló L formába megy át [78,77,94].

Az intermediereknek, az alapállapotban levő BR -hez viszonyított FTIR differencia spektrumai sok olyan információt tartalmaznak, melyekből bizonyos fehérje oldalláncok protonáltsági állapotára lehet következtetni a fotociklus egyes lépéseiben [30,95]. Az L forma egy 1740 cm^{-1} -nél megjelenő komplex spektrális sávval jellemezhető, amely elsősorban az $Asp - 96$ oldallánc perturbálása miatt jelenik meg [30,96,97]. Vita tárgyát képezte az, hogy a $K \rightarrow L$ átmenetben csak az $Asp - 96$ környezete változik meg [55], vagy maga az aszparaginsav deprotonálódik [30,98], de újabb eredmények az előbbi lehetőség mellett szólnak [97]. FTIR spektrumokból az is kitűnik, hogy az L -ben az $Asp - 85$ még deprotonált állapotban van [30,55,75,98,56].

Egyes 600 nm feletti hullámhosszaknál, illetve infravörös tartományban végzett spektroszkópiai mérések szerint a $K \rightarrow L$ átmenetet csak kétfázisu kinetikával lehet jól leírni [57,73,99]. Ezt a jelenséget meg lehet magyarázni ha a K és L közé egy visszareakció is kerül, azaz a K és L között tranziens egyensúly alakul ki [62,73,100].

Alacsony hőmérsékleten (201 K) az L lecsengése nagyon lelassul. Az ilyenképpen befagyasztott bakteriorodopszinból kivonták a retinált, amely az L állapotban $13 - cisz$ konformációjának bizonyult [101]. Későbbi tanulmányok kimutatták, hogy a kromofór geometriája azonos az L , M , N állapotokban, mindegyikben $13 - cisz$ izomer formájában van jelen [102]. A $K \rightarrow L$ átmenetben relaxálnak a kromofór körüli

szterikus feszültségek, azaz a K formát jellemző torzult 13 - *cisz* konformációjú kromofór állapota megváltozik [103]. Az L_{550} forma abszorpciós maximumának eltolódása feltehetően ennek a relaxációnak és azon fehérje oldalláncok elmozdulásának a következménye, amelyek a retinál bekötődési helyének a környezetében vannak.

A fotoelektromos mérések kis töltéselmozdulást mutatnak [82]. A jel negatív, akárcsak a $BR \rightarrow K$ átmenetre kapott, mintha egy pozitív töltés mozdulna el a protonpumpával ellentétes irányban. A fotoelektromos jel, valószínűleg töltött fehérje oldalláncok mozgásának, és a K állapotban még deformált retinál relaxációjának köszönhető.

2.2.4. Az M forma

Az L formából újabb termikus reakció nyomán körülbelül $85 \mu s$ alatt (szobahőmérsékleten, pH 7), kialakul a $412 nm$ -nél abszorbeáló hosszú élettartamu ($8 ms$) M intermedier. Újabb mérések szerint, az L bomlása komplex folyamat. pH 9 fölött az M forma kialakulása felgyorsul (kb. egy nagyságrenddel), eltűnése pedig lelassul, mitöbb, mind a két folyamat többfázisú kinetikát mutat [66,104,105,106,107]. Így az M kialakulásában még két másik komponens is megjelenik: $300 ns$ és $6 \mu s$ -os időállandókkal és a pH további növelése az időállandókat nem, csak a komponensek amplitúdóit változtatja [66,108,109]. Mások szerint az amplitúdók és az időállandók is változnak a pH-val [62,71,106].

Az észlelt kinetikai változások különféle analízisei különböző fotociklus modelleket eredményeztek. Az eltérések okait kereshetjük a kísérleti berendezések időfelbontásainak különbözősége, illetve a bR preparátumokat jellemző ionerősség, pH és hőmérsékletbeli különbségek között is. A többfázisú kinetika magyarázatára több modell is született. Az egyik szerint az ok a bR heterogenitásában keresendő, azaz kétfajta populáció keverékéről van szó, melyeknek az arányait a pH adja meg és amelyek párhuzamosan futó fotociklusokban végzik a protontranszportot [66]. A másik modell

szerint ez a multiexponenciális kinetika megmagyarázható egyetlen szekvenciális ciklus létezésével is, ha visszareakciót iktatunk be, azaz az $L \leftrightarrow M$ átmenetben egyensúlyi folyamattal kell számolnunk [71,73,100]. $\text{pH} \geq 7$ értékeknél az L eltűnik amikor az M koncentrációja a maximumát éri el [73]. Ezért az $L \leftrightarrow M$ egyensúlyt követően be kellett vezetni egy egyirányú folyamatot két, gyakorlatilag azonos abszorpciós spektrummal rendelkező M forma között: $M_1 \rightarrow M_2$ [100,106]. Különleges körülmények között: szolubilizált bakteriorodopszinban, illetve a jonon gyűrű közelében levő $\text{Asp} - 115$ kicserélése következtében, jól megkülönböztethető a két M forma abszorpciós spektruma [73,110]. Újabb mérések szerint, ha az $\text{Asp} - 96$ -ot kicseréljük aszparaginra, $\text{pH} < 6$ -nál az M_1 és M_2 abszorpciós maximumai eltávolodnak egymástól [107] és a két M forma között megjelenik egy $M_2 \rightarrow M_1$ visszareakció is [60].

A fenti modellel ellentétben, [62] szerint az L és M között kell léteznie egy új köztes terméknek, melynek az abszorpciós spektruma hasonló az L -éhez. Természetesen létezhetnek az említett modellek "keverékei" is: a bR pH függő populációi párhuzamosan futó fotociklusokkal, amelyekben az L és M között egyensúlyi folyamat van.

A bakteriorodopszin működése szempontjából az egyik legérdekesebb forma az M . A fotociklusban, valószínűleg az M kialakulása és bomlása során történnek a legnagyobb változások a molekulában. Ezt támasztják alá azok a mérések is amelyek kimutatták a fotociklus viszkozitástól való függését [111]. Az M -ben a kromofór geometriája $13\text{-}cis$, az L formáéhoz hasonlóan [102]. Az M_{412} abszorpciós maximumának a BR_{568} -hoz viszonyított kékeltolódását elsősorban a Schiff-bázis nitrogénjének deprotonálásával magyarázzák [112]. Raman spektroszkópiai mérések is azt mutatták, hogy nincs proton a Schiff-bázison: a $\text{C}=\text{N}$ kettőskötés rezgési frekvenciája a nitrogén protonvesztését kísérő tömegcsökkenésnek megfelelően nő [13].

Az $L \rightarrow M$ átmenetben tehát a Schiff-bázis elveszti protonját és egyidőben vele az $\text{Asp} - 85$ csoport protonálódik [30,113,114]. bR pontmutánsokon végzett FTIR



mérések kimutatták, hogy a protonált *Asp*-85 COOH vibrációja 1761 cm^{-1} -nél jelenik meg, illetve az *M* spektruma meglehetősen csökkent intenzitású kromofór sávot mutat [30,75,98]. Ugyancsak mutánsokon végzett mérések bizonyították, hogy az *Asp*-85-nek kulcsfontosságú szerepe van a protontranszportban [114,G1,G2]. Az *M* infravörös spektrumában 1739 cm^{-1} körül megjelenik egy COOH rezgés, amit kezdetben az *Asp*-212 protonálódásának tulajdonítottak [30]. Újabb mágneses magrezonancia [115] és FTIR spektroszkópiai mérések [116] eredményei azonban, azt bizonyítják, hogy ez a rezgési sáv az *Asp*-115 protonáltságát mutatja és az *Asp*-212 nem protonálódik a fotociklus során. A közelben levő tirozin oldalláncok protonáltsági állapotáról keveset tudunk, mert róluk a 295 nm -nél megjelenő abszorpciós változások adnak számot, ezekre pedig rátevéődik a triptofánok spektruma. A 240 nm körül megjelenő karakterisztikus abszorpciós változásokból azonban, következtetni lehetett egy szokatlanul alacsony pK_a -jú tirozin jelenlétére [105].

Az $L \rightarrow M$ átmenetre jellemző fotoelektromos jelekről kimutatták, hogy egy proton oldatban való megjelenésének tulajdoníthatók [117]. A jel előjele megfelel annak a képnek ami szerint egy proton távozik a fehérjéből a membrán extracelluláris oldalán [82]. A proton körülbelül az $L \rightarrow M$ átmenet életidejével jelenik meg az oldatban [114,108]. Valószínűnek tűnik, hogy a proton, miután elhagyja a Schiff-bázist egy kis ideig fehérje oldalláncokon tartózkodik, mielőtt még proton jelenne meg az oldatban. A Schiff-bázis protonja megközelítőleg 1 ms -ig nem hagyja el az *Asp*-85-öt, ezalatt már megjelenik egy proton az oldatban [55,98,113]. Feltehetőleg egy másik csoport veszi el protonját az *Asp*-85 protonálódásának következtében. Az extracelluláris tartomány protondonorja lehet az *Arg*-82, amely a Schiff-bázis és az *Asp*-85 közelében található [118]. Egyes kutatásokból úgy tűnik, hogy a protont egy hidrogénkötéssel összetartott komplex adja le, melynek alkotó elemei az *Arg*-82 mellett egy víz molekula [30], és egy tirozin: a *Tyr*-57 vagy a *Tyr*-185 [105]. Újabb molekuláris dinamikai számolások [119], valamint *bR* mutánsokon végzett mérések szerint azonban, a legvalószínűbb proton donor a *Glu*-204 [120]. Ez az aminosav a csatorna extracelluláris oldalán, a külső felülethez közel, mintegy 15 \AA távolságra helyezkedik el a Schiff-bázistól [11].

Alacsony pH értékeknél a bíbormembrán színe kékre vált. Ilyenkor a *bR* fotociklusában nem alakul ki *M* forma [121], és a fény elnyelése nem eredményez protontranszportot [108,122]. A protonpumpa blokkolása valószínűleg a proton akceptor *Asp* – 85 kezdeti protonálódásának tulajdonítható [6,22].

Amint az előbbieken láttuk, az *M* formának nagy valószínűséggel alállapotai is vannak. Miután az *M* állapot kialakult alacsony hőmérsékleten, különböző utakon fog bomlani, a hőmérséklet függvényében [123]. Elméleti megfontolások alapján is szükségesnek látszik több *M* forma létezése. Ahogy az előbbieken említettük az *M* kialakulása után proton jelenik meg az oldatban, még mialatt az *Asp* – 85 protonált. Ezért is két *M*-nek kell léteznie, mindkettő protonált *Asp* – 85-el, de az egyik protonált, a másik deprotonált *X* proton donorral. Másrészt amikor az *L*-ben a Schiff-bázis alacsony pK_a -jú formává alakul a protonleadást megelőzően, a kialakult *M*-ben szintén alacsony pK_a -jú lesz; aztán a fotociklus során olyan fehérje konformáció változásnak kell végbemennie aminek következtében a Schiff-bázis új környezetbe jut, ahol más csoportokkal kerül kölcsönhatásba és így módon reprotonálódik a citoplazma felőli oldalról [11,103]. Az *M* forma kialakulását követő konformációváltozást sikerült kimutatni [124]. A vad típusú és *D96N* mutáns bakteriorodopszinon végzett újabb mérések szerint, a fotociklus sebességi állandóinak a nyomásfüggése kisebb-nagyobb térfogatváltozásokat mutatott ki az átmenetek során [125]. A legnagyobb térfogatváltozás az M_1 és M_2 között észlelhető. A nyomás növelésével lassul az *M* bomlása és gyorsul az *N* lecsengése, azaz a Schiff-bázis reprotonálódása gátlódik és az *Asp*–96 protonfelvétele gyorsul. Ez az eredmény alátámasztja azt az elképzelést, ami az *M* formának az alapállapothoz viszonyított elektrondiffrakciós változásaiból született [126]: az F hélix citoplazmatikus végének a mozgása úgy "nyitja" a csatornát, hogy a Schiff-bázis hidratáltabb fehérjekörnyezetben könnyen reprotonálódhasson, majd "zárja" azt, hogy az *Asp* – 96 új protont vehessen fel hidrofób környezetben.

2.2.5. Az N forma

Az M állapot bomlása szintén multiexponenciális kinetikát mutat, amire a különböző fotociklus modellek sajátos módon adnak magyarázatot. Minden esetben elfogadott azonban az a tény, hogy az M köztesállapot egy 550 nm -nél abszorbeáló N intermedierbe megy át. Már a bR fotociklus első, egyirányú reakciókat tartalmazó modelljében megjelent egy 530 nm -nél abszorbeáló N forma [48]. Aztán egy ideig megkérdőjelezték az N létezését, úgyhogy ki is hagyták a fotociklus modellekből [127], később újra "felfedezték" [100,128]. Kinetikus rezonancia Raman spektrum mérések bizonyították, hogy az N az M állapotot követi [129], később ezt alacsony hőmérsékleti mérésekből valamint több hőmérsékleten és pH -n végzett abszorpciókinetikai adatok globális illesztéséből kapott adatok is alátámasztották [62,106,130]. A vibrációs spektrumban megjelenik a C=C kettőskötés rezgése 1531 cm^{-1} -nél, egy 1548 cm^{-1} körüli vállal, ami egy 550 nm -es abszorpció maximummal rendelkező formának felel meg [129].

Az $M \rightarrow N$ átmenetben a Schiff-bázis reprotonálódik, de a kromofór még mindig a 13-cis konformációjában van [129]. Annak ellenére, hogy az L_{550} és N_{550} formákban a retinál geometriája egyforma, illetve a Schiff-bázis mindkét esetben protonált, a vibrációs spektrumokban észlelt különbségek arra utalnak, hogy a két állapotban fehérje szerkezetbeli eltérések vannak [68,81].

Azokon a bR mutánsokon végzett mérések szerint, amelyekben az $Asp - 96$ -ot kicserélték, a Schiff-bázis reprotonálódása jelentős mértékben lelassult, így feltehetően ez a csoport tölti be a protondonor szerepét [56,100,131,G5]. Ilyen mutánsokon végzett korábbi FTIR mérések azt is kimutatták, hogy az $Asp - 96$ COOH rezgése 1738 cm^{-1} -nél jelenik meg, azaz protonáltsági állapota megfelel annak, hogy protondonor legyen [30,55,96]. Újabb vibrációs spektroszkópiai mérések pedig bebizonyították, hogy az 1738 cm^{-1} -nél, M -ben megjelenő sáv eltűnik az N kialakulása után, tehát valóban az $Asp - 96$ veszíti el a protonját [98,132,133]. pH 9.5 fölött az $Asp - 96$ meglehetősen

könnyen teljesíti a proton donor szerepét, ami szokatlanul magas pK_a -ra utal egy aszparaginsavnál [131], köszönhető ez az öt körülvevő hidrofób környezetnek is [11]. Az *Asp96* pK_a -ját csak a közelmúltban, mutánsokon végzett FTIR mérésekből lehetett meghatározni, és az érték valóban magasnak bizonyult: 11 [134]. A pH növelésével az *M* bomlása nagyon lelassul és a pH-val arányos lesz [128,131]. Ebből arra lehet következtetni, hogy amikor az *Asp-96* a *BR* alapállapotában deprotonálttá válik, azaz elveszti proton donor szerepét, a Schiff-bázis protont vehet fel egyenesen az oldatból [131]. Az *Asp-85* -ről kimutatták, hogy az *N* -ben még protonált állapotban van [30,113,96].

Amint azt az előbbiekben láttuk, az *M* bomlása legalább kétfázisúnak bizonyult és ezt különböző fotociklus modellek eltérően magyarázzák. A preparátum feltételezett heterogenitásából, vagy a fotociklus *M* előtti elágazásából kiindulva, egyesek párhuzamosan több *M* formát feltételeznek, amelyek különböző sebességi állandókkal bomlanak le [67,135,136,137,138,139]. Más modell szerint az *M* lecsengésének lassú komponense nem más, mint az *N* formának egy másodlagos fotoreakciója [128,74]. Megint mások szerint az *M* bomlás multiexponenciális kinetikája jól megmagyarázható az *M* és *N* állapotok közötti egyensúlyi folyamat létezésével, amit aztán az *N* bomlása követ egy elágazásmentes ciklusban [71,106,131,140]. Magas, $\text{pH} \geq 8.5$ értékeknél végzett kettős gerjesztéses kísérletek bizonyították egy $N \rightarrow M$ visszareakció létezését [140,141]. [140] szerint a protonfelvétel az *M* bomlás második időállandójával történik és nem az *N* lecsengésével, ezért két szekvenciális *N* formának kell léteznie amelyekben különböző az *Asp-96* protonáltsági állapota.

Az a megfigyelés, hogy a fotociklus eredményeképpen, pH -tól függően, nettó proton leadásról illetve felvételtől beszélhetünk, alkotta az alapját annak az elgondolásnak ami szerint az $L \rightarrow M$ átmenet után a fotociklus különböző utakon folytatódik, alacsony illetve magas pH értékeknél [60]. A fotociklus magas pH -n futó ágában főként az *N* forma, míg az alacsony pH -n futó reakciósorban az *O* állapot alakul ki [142]. Az *N* állapotban a kromofór még 13 - *cisz*, míg az *O* -ban már *all-transz* konformációban

van [129,143]. A szekvenciális, egyensúlyi reakciókat tartalmazó fotociklus modell szerint $\text{pH} > 6$ -nál, amikor a protonleadás megtörténik a ciklus első felében, tehát a fehérje elvesztett egy pozitív töltést, az ezáltal "megerősödött" ellenion megnöveli a retinál reizomerizációjának a potenciálját. Ugyanakkor más, közeli csoportok is deprotonálódhatnak, növelve a hatást. Ezért magas pH -n főként az N intermedier halmozódik fel [142]. Ilyen esetekben a két N forma közötti átmenetben történik meg az $\text{Asp} - 96$ reprotonálódása a citoplazma felől [140].

2.2.6. Az O forma és a kezdeti állapot visszaalakulása

Az N állapotot egy újabb intermedier, az O követi. Mivel a vad típusú bR -ben az O forma bomlása gyakorlatilag mindig gyorsabb, mint a kialakulása, a fotociklus nem fagyasztható be ennél a lépésnél, így az O köztesállapot tanulmányozása alacsony hőmérsékleti infravörös spektroszkópiai módszerekkel meglehetősen nehéz [57]. Az $N \rightarrow O$ átmenet során a kromofór reizomerizálódik, így ebben az állapotban a retinál konformációja *all - transz* [143,118]. Az O állapot $\text{C}=\text{C}$ kettős kötés rezgése 1508 cm^{-1} -nél jelenik meg, ami 645 nm -es abszorpciós maximumra utal [143,118]. Az O forma pontos spektrumának a meghatározása még mindig nyitott kérdés.

$\text{pH} 7$ -en és közepes sókoncentrációban az N körülbelül 3 ms alatt bomlik el [71,106]. Hősokkal perturbált O forma kinetikája arra enged következtetni, hogy az O egyensúlyban van az öt megelőző N állapottal [144,145]. Az egyensúly létezését támasztják alá különféle spektrumillesztési módszerek eredményei is [62,106,113]. [71] szerint az $N \rightarrow O$ átmenet sebességi állandója pH független, ezzel ellentétben [106] -ben jelentős pH függést találtak. Mitöbb, az N lecsengése - pH -tól függően- két úton történhet: az O formán keresztül, vagy egyenesen a BR kezdeti állapotába [72].

Amint azt az előbbi paragrafusban részleteztük, létezik olyan modell, amely szerint az M után a fotociklus pH -tól függően különböző utakon zárul [60]. Ezen modell szerint $\text{pH} < 6$ értékeknél az extracelluláris protonleadás csak a fotociklus végén, a

kezdeti *BR* állapot kialakulásakor történik meg, ezért a pozitívan töltött extracelluláris protonleadási tartomány következtében gyengül a Schiff-bázis ellenionja. Ezt a hatást más itt lévő csoportok protonálódása is növelheti. Ennek eredményeképpen a retinál körül gyengül a π elektronok hatása és a reizomerizáció potenciálfa csökken. A Schiff-bázis protonálódását követi a retinál *all* – *transz* formába való átalakulása, és az *O* állapot alakul ki [142].

pH < 6 -nál úgy tűnt, hogy az $N \rightarrow O$ során a fehérje egy újabb protont vesz fel, és a protonfelvétel időállandója körülbelül megegyezik az átmenet időállandójával [146,147]. Későbbi eredmények azonban arra utalnak, hogy alacsony pH értékeknél a protonleadás késik: csak a fotociklus $O \rightarrow BR$ lépésében játszódik le és az *Asp* – 96 protont vesz fel a citoplazmából az $N \rightarrow O$ átmenetben [60]. Vibrációs spektroszkópiai mérések is azt mutatták, hogy az $M \rightarrow N$ során deprotonálódott *Asp* – 96 csoporthoz proton kötődik [75]. Mivel ez a proton a külső környezetből kerül az *Asp* – 96 -ra, az *N* bomlás sebességi állandója függ a külső protonkoncentrációtól, azaz az oldat pH -jától, [106] -al egyetértésben. Az *Asp* – 85 oldallánc még mindig protonált állapotban van az *O* -ban [56].

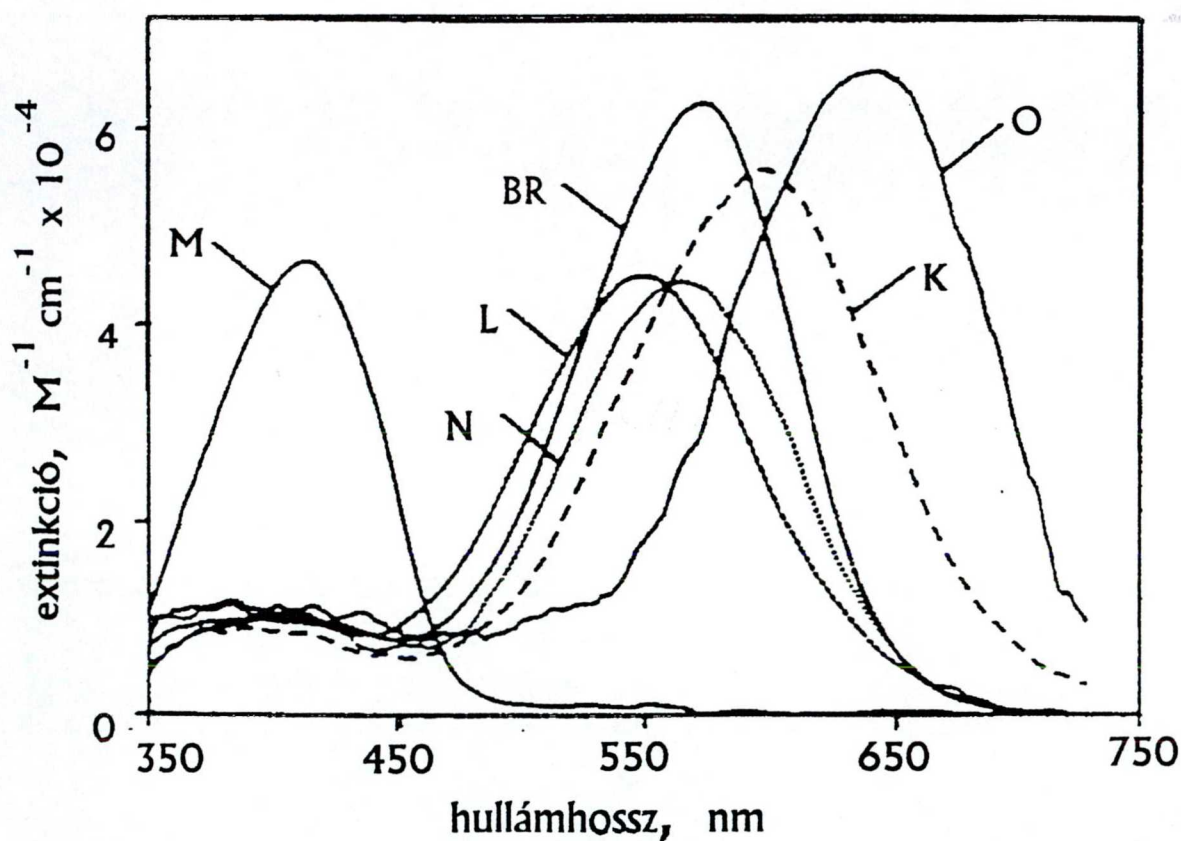
Fotoelektromos mérések [146] valamint pH érzékeny festékekkel végzett kísérletek [147] is bizonyították, hogy a fehérje az $N \rightarrow O$ átmenetben veszi fel a protont, a korábbi elképzelésekkel ellentétben, ahol ezt a folyamatot az $M \rightarrow N$ lépéshez kapcsolták.

Az $N \rightarrow O$ átmenetben tehát az *Asp* – 96 protont vesz fel és a kromofór reizomerizálódik *all* – *transz* formává [143,118]. A két folyamatot még nem sikerült kinetikailag is különválasztani, de ésszerű feltételeznünk, hogy az *O* forma két alállapotát határozzák meg. [148] -ben be is vezettek két szekvenciális O_1 illetve O_2 formát.

Közepes sókoncentrációban és pH 7 -en az *O* intermedier 5 ms alatt visszaalakul a *BR* kezdeti állapotába. Ebben a lépésben valószínűleg az *Asp* – 85 elveszíti protonját,

amelyet az extracelluláris proton leadási tartomány X proton donor csoportja vesz fel. Valóban a vibrációs spektroszkópia eredményei szerint a protonált karboxilcsoport 1760 cm^{-1} rezgése (15°C -on) az $O \rightarrow BR$ átmenet időállandójával cseng le [56]. Az $O \rightarrow BR$ folyamat egyirányú reakció.

Optikai sokcsatornás analizátorral (OSMA) végzett abszorpciókinetikai mérések alapján meg lehet határozni a bR köztes állapotainak spektrumait [73], ezek láthatók az 5. ábrán.



5. ábra. A bakteriorodopszin fotociklusában megjelenő köztes állapotok abszorpciós spektrumai.



2.3. A PROTONTRANSPORT MECHANIZMUSA

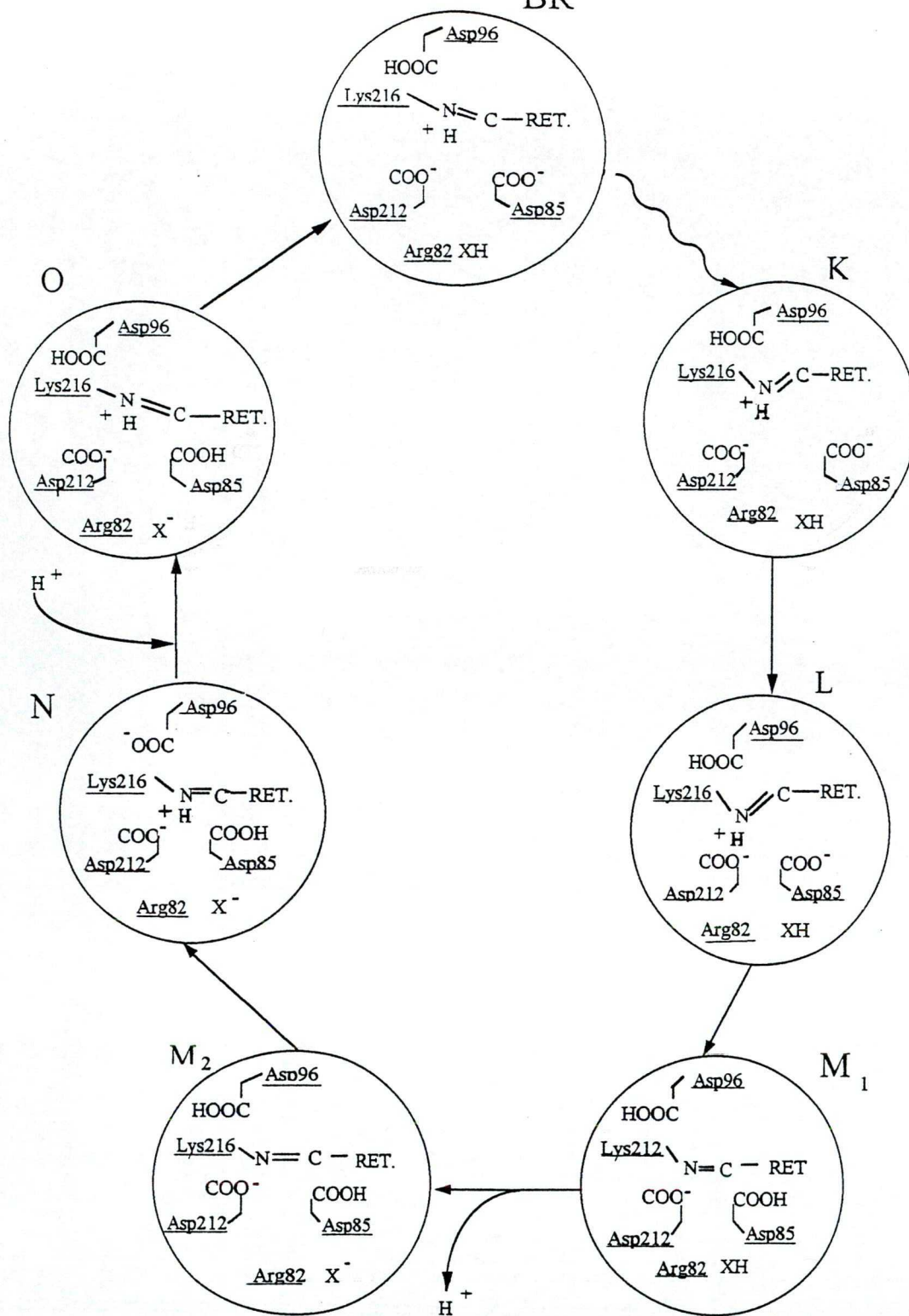
A fényel gerjesztett bakteriorodopszin a fotociklusa során proton aktív transzportját hozza létre a membránon keresztül, ezáltal valósítva meg a fényenergia átalakítását proton elektrokémiai potenciállá [3,149]. pH 7 -en körülbelül 10 ms alatt lezajlik a kromofór fotoizomerizációja, a proton leadás, majd az új proton felvétele végül a retinálnak az eredeti geometriájába való visszaállása.

A *bR* protonpumpaként való működésének pontos molekuláris mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Amint azt az előbbieken láttuk a spektroszkópiai mérési adatok illesztése fotociklus modellekkel még korántsem egyértelmű, ezzel magyarázható az egyes molekuláris lépések különféle, modelltől függő értelmezése. Ennek ellenére azért már van, ha nem is minden részletében, de a fő lépésekben általánosan elfogadott képünk arról, hogy miként valósítja meg a protontranszlokációt ez a fehérje. Az előző fejezetben felsorakoztatott kísérleti eredmények alapján a *bR* működésére alkotott, aránylag széles körben elfogadott modellt fogjuk ismertetni a következőkben.

Az *bR* fotociklusában megjelenő köztes állapotokra jellemző, opszin és kromofórbeli változások a 6. ábrán követhetők.

A fotociklus első lépéseiben ($BR \rightarrow K$ átmenet) az elnyelt fény energiája elsősorban elektrosztatikus energiává alakul át, ugyanis a *K* állapot kialakulásáig a kromofóron *all-transz* \rightarrow *13-cisz* izomerizáció játszódik le, és ennek következtében a Schiff-bázis eltávolodik ellenionjától.

A fotociklus további lépéseiben a *K*-ban tárolt energia használódik el a citoplazmából az extracelluláris tartományba történő vektoriális protonátvitelre. Ennek a folyamatnak molekuláris történései lehetnek az egyes proton donor illetve akceptor fehérje oldalláncok "átorientálódása" a membrán egyik oldalától a másik felé, vagy ezen csoportok pK_a változásai [150].



6. ábra. A protontranszlokáció mechanizmusa a bakteriorodopszinban. Az ábrán a retinából csak a Schiff-bázist, valamint egy pár fehérje oldallánc karboxil kötéseit tüntettük fel.

A legtöbb modell mindkét mechanizmus létezését szükségesnek tartja.

A fotociklus következő lépésében, a $K \rightarrow L$ átmenet során relaxál a kromofór 13 – *cisz* torzult konformációja. Az $L \rightarrow M$ lépésben a Schiff-bázis átadja protonját a tőle extracelluláris tartomány felé levő Asp – 85 aszparaginsavnak. Az Asp – 85 protonálódásának következtében valószínűleg a közeli proton donor csoport protonja lép ki a külső térbe.

Ezt a lépést követi a Schiff-bázis átfordulása a membrán extracelluláris oldalától a citoplazmatikus felé, ami az M forma kialakulását követő fehérje konformáció változás során valósul meg. A Schiff-bázis "átkapcsolása" két úton valósulhat meg: a proton transzportban résztvevő fehérje oldalláncok pK_a változásain keresztül, vagy geometriailag, a proton akceptorok illetve donorok közötti távolságok és szögek változásai által létrehozott potenciálfal különbségeken keresztül. Természetesen a kétféle mechanizmus együtt is létezhet.

Az $M \rightarrow N$ átmenetben a Schiff-bázis protont vesz fel az Asp – 96 -ról. A Schiff-bázis reprotonálódását az előző lépésben történt protonvesztés során kialakult negatív környezet is segíti. Az Asp – 96 -os oldallánc az $N \rightarrow O$ átmenetben reprotonálódik és a kromofór reizomerizálódik: a retinál *all-transz* konformációba kerül. Az $L \rightarrow M$ során protonálódott Asp – 85 még mindig protonált állapotban van az O -ban. Feltehetően ezen csoport és a pozitívan töltött Schiff-bázis közti elektrosztatikus taszítás hatására az $O \rightarrow BR$ átmenetben az Asp – 85 átadja protonját a közeli X proton donor csoportnak, így módon zárva a fotociklust. A proton donor nagy valószínűséggel a Glu – 204 amely három, hidrogén-híd kötéssel összetartott víz molekulán keresztül az Arg – 82 -vel áll kapcsolatban [120].

pH érzékeny festékekkel végzett abszorpcióváltozás mérések azt mutatták, hogy magas pH -nál a proton leadás megelőzi a proton felvételt, de ha a pH kisebb az extracelluláris proton akceptor csoport pK_a -jánál, habár a proton felvétel körülbelül ugyan-

abban az időben megtörténik, a proton leadás az $O \rightarrow BR$ lépésig késik. Mindenképpen a fotociklus eredménye nettó proton átvitel a citoplazmából az extracelluláris térbe.

Annak a tisztázása, hogy miként vezetnek a fehérje és kromofórbeli változások különböző aminosavak és a Schiff-bázis pK_a változásaihoz, új kutatások tárgyát képezi, de a választ megtalálni nem egyszerű. A Schiff-bázis pK_a -ját alacsony sókoncentrációban meghatározták, értéke 13.3 [151]. Oldatban levő retinálók protonált Schiff-bázisainak a pK_a -ja 7.4. A fehérjébe való bekötődéskor kapott magasabb pK_a , feltehetően a Schiff-bázis és ellenionja közötti gyenge hidrogénhid kötés kialakulásával is magyarázható [152]. Mások szerint a közeli *Asp* – 85 csoportnak is nagy szerepe van a Schiff-bázis pK_a -jának a megnövelésében [23,24]. A fotociklus során a Schiff-bázis pK_a -ja erősen csökken ahhoz, hogy az $L \rightarrow M$ átmenetben megtörténhessen a protonleadás. Lehetséges, hogy egy közelben levő kation, vagy az *Arg* – 82 közeledése a Schiff-bázishoz, valamint a hidrogénhid kötés geometriájában történő változások okoznak ekkora csökkenést a pK_a -ban [11,153]. Más elméletek szerint a retinál $C_{14} - C_{15}$ egyesítésében megjelenő deformáció is okozhat pK_a csökkenést a Schiff-bázisban [154], akár csak az L forma kialakulása során észlelt polárosból hidrófóbbá változó környezet a Schiff-bázis körül [11]. Ugyanakkor egyes számolások azt mutatják, hogy a $C_{13} = C_{14}$ kettőskötés transz-cisz rotációja elszakítja a retinál polién lánc körüli π elektronok rendszerét. Ennek következtében csökken az elektronsűrűség a Schiff-bázis nitrogénjén és ez instabilabbá teszi a proton helyzetét a kötésen [155,156]. Mivel a retinál polién láncát és jonon gyűrűjét triptofán csoportok rögzítik [11], az izomerizáció arra kényszeríti a Schiff-bázist, hogy egy más, feltehetően elektronegatívabb környezetbe mozduljon el [157].

A magas protonaffinitással rendelkező *Asp* – 96 gyakorlatilag az egész fiziológiás pH tartományban a protondonor szerepét tölti be [134]. Szerkezetileg azonban ez az aszparaginsav és a G hélixen levő, pozitívan töltött *Arg* – 227 olyan helyzetben vannak [11], hogy kölcsönhathatnak, és így egymáshoz való közeledésük okozhatja a fotociklus végén az *Asp* – 96 pK_a -jának átmeneti csökkenését [140,148].

A felsorolt mechanizmusok közül szinte mindegyik fehérjekonformáció-változást igényel. A protontranszport vektorialitását a Schiff-bázisnak a külső tér illetve a citoplazma felé való "átorientálódása" biztosítja. Abban még nincs általános egyetértés, hogy ez az átkapcsolás pontosan a fotociklus melyik átmenetében történik, mindenesetre azt tudjuk, hogy valahol az M kialakulása és az N között. Kisebb-nagyobb fehérje konformáció változásokkal a fotociklus csaknem összes lépésében számolnunk kell. Ezen folyamatok feltérképezése még a jövőbeli kutatások nagy kihívása.

2.4. A PROTONTRANSPORT VIZSGÁLATA BAKTERIORODOP-SZIN MUTÁNSOK SEGÍTSÉGÉVEL

A bakteriorodopszinon végzett sikeres pontmutációk új lehetőségeket nyújtanak a fehérje tanulmányozására. A mutánsokon végzett spektroszkópai tanulmányok jelentős mértékben segíthetnek a fotociklus megoldásában, ugyanis bizonyos csoportok kicserélése másokra egyes átmenetek megszűnését, a fotociklus egyszerűsödését eredményezhetik. Ilyen esetekben általában könnyebben és pontosabban modellezhető a megmaradt reakciósor. Ugyanakkor ezekből a kísérletekből következtetni lehet bizonyos aminosavaknak a proton transzportban betöltött szerepére. A mutáns fehérje szerkezetében azonban történhetnek olyan változások, melyek következtében a vad típusú bakteriorodopszinnal végzett összehasonlítások már nem helyénvalóak. Ezért minden esetben nagyon fontos a mutáns szerkezeti jellemzése, a vad típusú fehérjéhez képest észlelt különbségek meghatározása. Messzemenő következtetések levonására azok a mutánsok a legalkalmasabbak, amelyekben egy oldalláncot cseréltek ki, illetve amelyek a fotociklusban csak egy pár átmenet sebességi állandóját változtatják meg. Egyes bakteriorodopszin mutánsokban gond lehet a fényadaptálással: csak a molekulák egy részében történik meg a kromofórok *all* – *transz* -ba való izomerizálódása, a többiben a retinál 13-*cisz* konformációban marad. Mindezek ellenére a *bR* mutánsokon végzett mérések egyre gyakoribbak, és kétségtelen, hogy az eredmények nagy mértékben hozzájárulnak a protontranszport molekuláris mechanizmusának megértéséhez.

A bakteriorodopszin mutánsokat először az *Escherichia coli* -ban fejezték ki [158,159,160], de a fehérje csak körülményes kristályosítások után képezett bíbormembránszerű szerkezetet [161]. Ezeken a mutánsokon végzett kísérletek egyes aminosavaknak a fehérje szerkezetében és működésében betöltött szerepére szolgáltatott adatokat [115]. Később, amikor a mutációkat sikeresen el lehetett végezni az eredeti *Halobacterium salinarium* -ban [162], nyilvánvalóvá vált, hogy a két különféle baktériumban kifejlesztett azonos mutánsok spektroszkópai jellemzői különböznek [24,163]. A különbségek feltehetően azzal magyarázhatók, hogy az *Escherichia coli*-

ban kifejezett mutánsok nem alkotnak ugyanolyan kristályszerkezetet mint a *bm* és a retinál is más arányban tartalmazza a 13 – *cisz* / *all* – *transz* izoméereket.

Habár az eddigiekből már kitűnik a mutánsokon végzett kísérletek jelentős szerepe a bakteriorodopszin működésének megértésében, a következőkben részletesebben kitérünk erre a tárgykörre elsősorban a *Halobacterium salinarium* -ban kifejlesztett *bR* mutánsokon végzett mérésekből származó eredményekre támaszkodva.

2.4.1 Mutációk az extracelluláris proton leadás tartományában

Az opszinnek az extracelluláris tér felé eső részében helyezkednek el azok az aminosavak melyeknek szerepe az, hogy protont "vezessenek ki" a külső térbe. Amint azt az előbbieken láttuk a Schiff-bázis a protonját az *Asp*–85 csoportnak adja át az *M* kialakulása során [30,114]. Bakteriorodopszin pontmutánsokon végzett FTIR mérések kimutatták, hogy a protonált *Asp* – 85 COOH vibrációja 1761 cm^{-1} -nél jelenik meg [30,75,98]. Az aszpartát aszparaginra való kicserélése során kapott *D85N* mutánsban hiányzik a negatívan töltött proton akceptor oldallánc. Ennek következtében a Schiff-bázis csak kis mértékben deprotonálódik [164,165,166] és a proton inkább a citoplazma felé mozog nem az extracelluláris térbe [164,165,167]. Ugyanakkor az ilyen mutánsokban nincs nettó proton átvitel [22,114,115,164,168,169,G1,G2]. Ez az eredmény újabb bizonyítéka annak, hogy az *Asp* – 85 oldalláncnak kulcsfontosságú szerepe van a protontranszportban.

Annak ellenére, hogy a közelben levő *Asp* – 212 nem proton akceptor, a *D212N* mutánsban, $\text{pH} > 7$ értékeknél a Schiff-bázis protonált marad és protontranszport sem történik [24,169,G1,G2]. A *D85N* illetve *D212N* mutánsok *all* – *transz* fotociklusaiból hiányoznak az *M*, *O* formák és a ciklust a $BR \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow N \rightarrow BR$, szekvenenciális reakcióssal lehet leírni, $\text{pH} 6$ fölött a *D85N* mutánsnál [165] és $\text{pH} 7$ fölött a *D212N* mutánsnál [24]. Az utóbbi esetben először egy második *L* állapotot vezettek be kinetikai megfontolásokból [24], amiről a későbbiekben a Fourier transzformált infra-

vörös mérések kimutatták, hogy tulajdonképpen egy N -szerű formáról van szó [170].

Az ugyancsak ebben az extracelluláris fehérje tartományban található $Arg - 82$ helyettesítése más csoportokkal enyhébb változásokat okoz a bR fotociklusában. Először is, a Schiff-bázis deprotonálódása körülbelül 10-szeresére gyorsul [44,166], ami feltehetően a közeli $Asp - 85$ pK_a -jának a növekedésével függ össze. Másodszor, az $L \rightarrow M$ átmenetben nem jelenik meg egy proton a külső térben [163,171], ami arra utal, hogy az $Arg - 82$ nélkül nem működik a normális extracelluláris proton leadás. Harmadszor, a fotociklusban nem jelenik meg az O forma, ami megmagyarázható ha a Schiff-bázis ellenionja hatással van az $N \rightarrow O$ átmenetben lejátszódó reizomerizációra. Ezek szerint az $Arg - 82$ más aminosavval való helyettesítése során az ellenion negatívabbá válik, megerősítve a retinál körüli π elektronok rendszerét, aminek következtében megnő a reizomerizáció potenciálfa [156].

A fentebb említett három aminosav: $Asp - 85$, $Asp - 212$ és $Arg - 82$ a Schiff-bázissal kölcsönhatásban levő ellenion részét alkotják. Az aszpartátok helyettesítése más, nem töltött csoportokkal az abszorpciós maximum vöröseltolódását, az arginin kicserélése pedig a kék felé való eltolódását eredményezte. Az eredmények megfelelnek azoknak a változásoknak amit a negatívan, illetve pozitívan töltött oldalláncok eltávolítása a Schiff-bázis környezetéből okozhat [85,152]. Természetesen a két aszpartát szerepe nem azonos. A $D85N$ mutánsban az abszorpciós maximum 47 nm -el tolódik el a vörös felé [22,107,165] és a Schiff-bázis pK_a -ja 7-re esik le [165]. A $D212N$ mutánsban a vöröseltolódás csak 15 nm és a pK_a nem változik [22,24].

A $D212N/R82Q$ dupla mutánsban végzett mérések célja volt megvizsgálni, hogy egy negatív és egy pozitív töltés eltávolításával, de a Schiff-bázis tartomány nettó töltését változatlanul hagyva miként változnak a protonpumpálás folyamatai [172]. A fotociklusban nem halmozódik fel M állapot, azaz a Schiff-bázis protonált marad, ennek ellenére a fehérje megvalósítja a protontranszportot, feltehetően egy teljesen más mechanizmus alapján.

Ugyancsak mutánsokon végzett új mérések eredménye az, hogy az extracelluláris proton leadás tartományában levő *Glu* – 204 csoport tölti be nagy valószínűséggel a proton donor szerepét [120]. Amikor a *Glu* – 204 -t glutaminra cserélték ki megszűnt a proton leadása, nem így amikor a csoportot aszpartáttal helyettesítették. Az FTIR mérések azt mutatták, hogy a *Glu* – 204 protonált a *BR* alapállapotban és deprotonált az *M* -ben [120]. A *bR* szerkezeti képéből és molekula dinamikai számolásokból úgy tűnik, hogy a *Glu* – 204 három vízmolekula hidrogénhid kötéssel összetartott láncolatán keresztül kapcsolódik az *Arg* – 82 csoporthoz [11]. Utóbbi aminosav pedig, újabb vízmolekulákon keresztül az *Asp* – 85 -el van kölcsönhatásban. A *Glu* – 204 pK_a -ja a fehérje *M* formájában kellően alacsony ahhoz, hogy amikor az *Asp* – 85 protonálódik, a vízmolekulák láncolatán keresztül az *Arg* – 82 pozitív töltése a *Glu* – 204 -re kerüljön át. Ezután a *Glu* – 204 leadja protonját a környezetének [120].

A Schiff-bázis közelében levő *Tyr* – 185 illetve *Tyr* – 57 oldalláncok is részei lehetnek az ellenion komplexnek, de róluk még nem sokat tudunk. A *Tyr*185 kicserélése fenilalaninra a protontranszport aktivitásának 2/3 -os csökkenését eredményezte, ami arra utal, hogy habár ez a csoport is részt vesz a proton transzferben, annak nem nélkülözhetetlen eleme [173]. FTIR mérések szerint a *Tyr* – 185 protonált a *K* állapotban és deprotonált az *M* -ben, így feltehetően ez a csoport a fotociklus kezdeti lépéseiben játszik szerepet [174].

A *D115N* mutánson végzett mérések szerint az *Asp* – 115 az *M* kialakulásában tölt be valamilyen szerepet [60]. Újabb mutánsokon végzett kísérletek azt a kérdéskört próbálják megoldani, hogy a *Val* – 49 illetve *Ala* – 53 aminosavak miként valósítják meg a kromofór bekötődési helyének, azaz a *Lys* – 216 oldalláncnak a kitámasztását [61].

2.4.2 Mutációk a retinál körül

A retinál környezetében levő fehérje oldalláncok teszik lehetővé a kromofór

bekötődését, ezek határozzák meg az egyébként lineáris polién lánc szénkötéseinek a rotációit, torzulásait a fotociklus egyes lépései során. Az olyan mutánsokon végzett kísérletek, ahol egyes oldalláncokat más, tőlük különböző formájú és térfogatú csoportokkal cserélnék ki, hasznos adatokat szolgáltatottak e folyamatok megértéséhez. A molekuláris történések pontos leírásához azonban, a *bR* jobb felbontású szerkezeti képére is szükség van.

A *Trp* – 182 és *Trp* – 189 aromás aminosavak tartják megfelelő pozícióban a kromofór polién láncát [11,31,32]. Ezen triptofán csoportok helyettesítése más aminosavakkal az abszorpciós maximum eltolódását eredményezte [33]. A *W182F* illetve *W189F* mutánsokban a vad típusú *bR* -től eltérően, a kezdeti gerjesztett állapotban lezajló *all* – *transz* → 13 – *cisz* izomerizációja a kromofórnak nagyon lelassul [175,33,176]. A *W182F* mutánsban az *M* forma kialakulása is lassabb és FTIR mérések szerint ez azzal magyarázható, hogy a retinál rögzítő *Trp* – 182 eltávolításával megszűnik az a szterikus feszültség a lánc 9-metil csoportja körül, ami normális állapotban a Schiff-bázis pK_a -ját csökkentette az *L* -ben [177]. A *W182F* mutánsban az *N* bomlás sebességi állandója csökken és *O* forma nem halmozódik fel [176], tehát a retinál reizomerizációja is meglehetősen lelassul.

A *Leu* – 93 a retinál 13-metil csoportjának közvetlen közelében helyezkedik el [11]. Ha ezt az aminosavat kisebb térfogatú alaninnal vagy treoninnal helyettesítjük, a fotociklus végén észlelünk változásokat: a kezdeti állapot visszaalakulása lelassul és *N* + *O* formák keveréke halmozódik fel [171,178,179].

2.4.3 Mutációk a citoplazmatikus proton felvétel tartományában

Az opsinnak ebben a részében található az *Asp* – 96 csoport amely a protonátvitelben a Schiff-bázis proton donorjának a szerepét tölti be. A *D96N* mutánsban abszorpció kinetikai méréseket végeztek csak, amelyekből aztán fotociklus modell is született a mutált fehérjére [73,115,60,180,G5]. Az *Asp* – 96 kicserélése aszparaginnal

lelassítja és pH függővé teszi az M forma bomlását [60]. A vad típusú bR -nél észlelt kétfázisú kinetika, a mutánsnál egyfázisúvá válik pH 5 fölött. Az egyszerűsödő kinetika arra utal, hogy a proton donor hiányában a Schiff-bázis közvetlenül a citoplazmatikus oldalról protonálódik. A preparátumhoz adott azid felgyorsítja az M bomlását, feltéhetően az $Asp - 96$ proton donor szerepét véve át [181,G5].

Az $Asp - 96$ és Schiff-bázis közötti távolság körülbelül 12 \AA , ezért valószínűleg más csoportok is közrejátszanak a protonátadásban. A folyamatokban a víznek is nagy szerepe van, erre utalnak a nehézvízzel végzett mérések is: a $H_2O - D_2O$ kicserélés a $D96N$ mutánsnál az L utáni átmenetek lassulását eredményezte [G7]. A $Thr - 46$ és $Arg - 227$ kölcsönhathatnak az $Asp - 96$ -al elektrosztatikusan és/vagy hidrogénhíd kötésen keresztül [182]. Helyettesítésük más aminosavakkal a fotociklus $M \leftrightarrow N \rightarrow BR$ részében okoznak változásokat. A $Thr - 46$ kicserélése valinra az $M \leftrightarrow N$ egyensúlyt N felé tolja el, azaz az M bomlás gyors komponensét látjuk [163,183,184]. Ezzel ellentétben az $Arg - 227$ kicserélése glutaminra az egyensúlyt az M felé tolja el: az M eltűnés lassú komponense jelenik meg [140,163,185,186]. Ugyanakkor az $N \rightarrow BR$ átmenet lelassul a $T46V$ mutánsban, illetve felgyorsul az $R227Q$ -ban. Ezekből az ellentétes hatásokból úgy tűnik, hogy $Thr - 46$ hiányában a Schiff-bázis könnyebben protonálódik, de ez a tartomány nehezebben vesz fel újabb protont a citoplazmából, míg az $Arg - 227$ kicserélésének pontosan ellenkező következményei vannak.

Az $M \leftrightarrow N$ átmenet során lezajló konformáció változások tanulmányozására a közelmúltban olyan bR mutánsokat készítettek, amelyekben a hélixek citoplazma felőli végére cisztein csoportokat tettek, majd ezekre maleimid vegyületeket kötöttek. Ezek a bekötések általában nem okoztak lényeges változásokat a fotociklusban, kivéve amikor azt az F hélixen végezték [187]. Ezeknél a mintáknál a Schiff-bázis reprotonálódása felgyorsul és az $Asp - 96$ proton felvétele gátlódik: a csoportok bekötésével megkönnyítették az F hélix által végzett csatorna kinyitást és hidratálást, illetve gátolták a bezárását, azaz a hidrofób környezet visszaállását. Ugyanakkor a hélixek mozgásának teljes gátlása ellentétes változásokkal járt. Az eredmények összhangban

vannak előző elektrondiffrakciós mérésekkel [126].

Amint az előbbieken láttuk, a bakteriorodopszin pontmutánsokon végzett kísérletek jelentős segítséget nyújtanak a protontranszport mechanizmusának megértésében. Az így kapott eredmények hozzájárulnak egy pontosabb globális kép kialakításához a fehérje működéséről, de még rengeteg olyan kérdés van, melyek megválaszolásában a jövőben kidolgozandó, új pontmutánsok segítséget tudnak nyújtani.

2.5. A FEHÉRJE ELEKTROMOS VÁLASZJELÉNEK ELMÉLETE

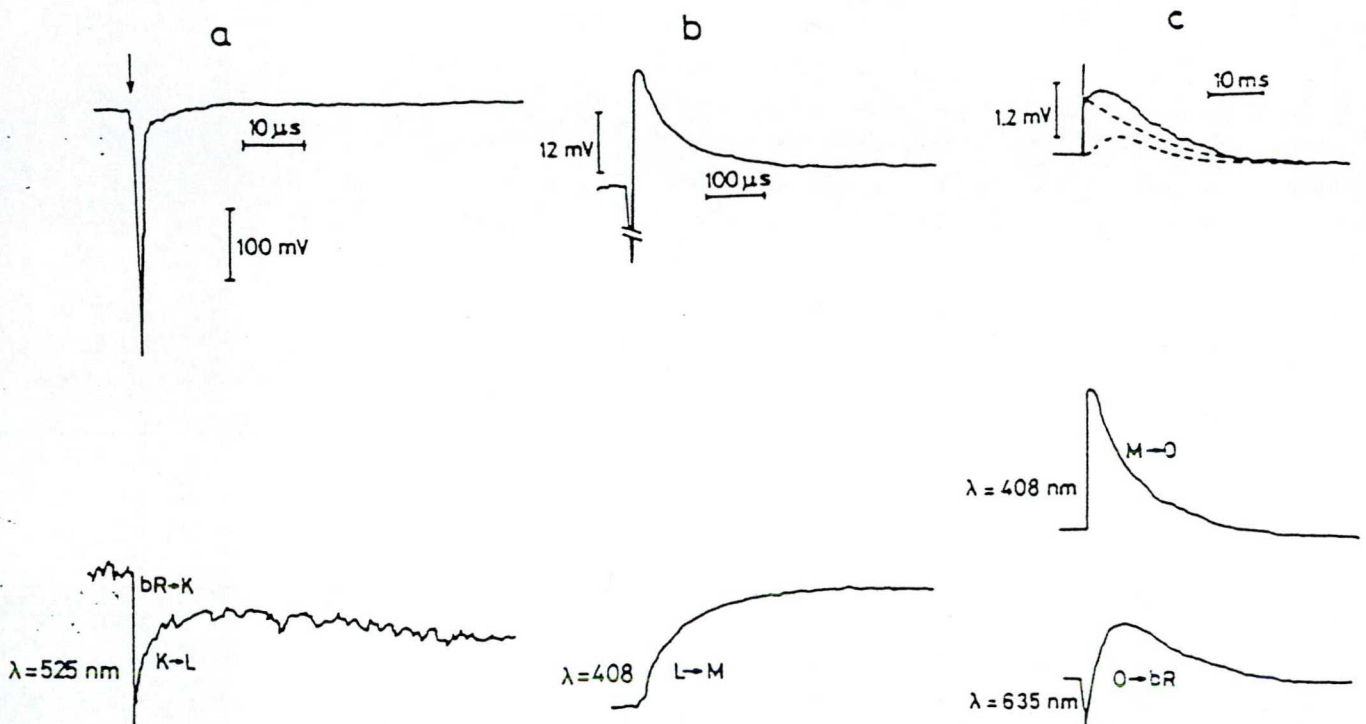
Mivel a kísérleteinkhez alkalmas mintakészítés és mérési módszerek előző kutatások alapján történtek, a továbbiakban ezeket ismertetem, még mielőtt rátérnék az általunk sajátosan használt módszerek bemutatására.

Elektromos jeleket mértek már különböző, bR -t tartalmazó, elektromos szempontból aszimmetrikus rendszereken. Ilyenek például azok amelyekben a bíbormembránokat, illetve a vezikulákba beépített fehérjét töltött felületre, pl. bimolekuláris lipidmembránokra vitték fel [188,189,190,191]. Ezeken a komplex rendszereken mért jelek azonban nehezen értelmezhetőek és mivel azonos körülmények között abszorpciókinetikai méréseket nem lehet végezni, messzemenő következtetéseket nem lehet levonni [82].

Ezért munkánkban az SZBK, Biofizika Intézetében kidolgozott bR kísérleti rendszert használtuk, mint az egyetlen olyan ismert rendszert amin mindkét típusú kísérlet elvégezhető azonos mérési körülmények között. A módszer alapját az a megfigyelés képezi, hogy bizonyos magas fehérje tartalmú membrán fragmentumok oldatban is nyitottak és elektromos térben jól orientálhatók permanens dipólusmomentumuknak köszönhetően [15,192,G8]. Ilyenek a bíbormembránok is, amelyek jelentős ($\mu = 2 \times 10^{-23} Cm/\mu m^2$) permanens dipólusmomentumsűrűséggel rendelkeznek és így már 10 – 20 V/cm -es sztatikus elektromos térrel is jól orientálhatók [15,192]. Ez a dipólusmomentum a membrán normálisának az irányába mutat, és ily módon az elektromos térre merőlegesen beálló bm -ek megfelelő oldalai egy irányba néznek [15]. A kapott rendezettség következtében a rövid fényimpulzussal szinkronizált töltésmozgások összegeződnek és ezt a fehérje elektromos válaszjeleként (PERS) mérjük [92,193]. Az orientáció a tér kikapcsolása után még 300 – 500 ms -ig megmarad, jóval tovább mint a fotociklus időtartama [192]. Az elektromos térrel orientált bm -ek szuszpenzióján abszorpciókinetikai mérések is végezhetőek. Mivel az elektromos és az abszorpciókinetikai jelek között szoros korreláció van [92], ezekből a mérésekből a

fotoelektromos jelek kvantitatívan is értelmezhetők.

Elektromos térrel orientált *bm* -ek vizes szuszpenziójára jellemző fotoelektromos és abszorpciókinetikai jelek láthatók a 7. ábrán, a [193] dolgozat alapján. A méréseket az orientáló feszültség kikapcsolása után, de még orientált állapotban levő membrán fragmentumok szuszpenzióján végezték. A PERS jelek időállandói azonosak a fotociklus átmeneteinek időállandóival [92,193].



7. ábra. Fotoelektromos és abszorpciókinetikai jelek orientált bíbormembránok vizes szuszpenzióján. A jeleket különböző időfelbontásban mérték (a-c), 5°C (a), illetve 22°C (b,c) hőmérsékleteken.

Az első jelentős mérések kiértékelésére dolgozták ki Keszthelyi L. és Ormos P. a fehérje elektromos válaszjelek (PERS) elméletét [92,193], aminek alapján meg lehet

határozni, hogy a mozgó töltés milyen irányban és mekkora távolságra mozdul el a fotociklus egyes átmenetei során. A továbbiakban az elmélet alapját képező számolásokat mutatjuk be.

Válasszunk ki egy bíbormembrán fragmentumot és számoljuk ki azt az eltolódási áramot amit egy Q töltés mozgása indukál két elektróda között. Az elektrodinamika Ramo-Shockley tétele szerint ez az áram a következő:

$$i(t) = \frac{Qv(t)}{\epsilon D'} , \quad (1)$$

ahol $v(t)$ a töltés sebessége, D' az elektródák közötti távolság és ϵ a fehérje dielektromos állandója. Feltételezhető, hogy a töltés nagyon gyorsan mozog, mintegy átugrik egyik helyről a másikra. Az (1) egyenlet idő szerinti integrálja megadja az elektródákon indukálódó töltést:

$$Q_{ind} = \int_0^\infty i(t)dt = \frac{Q}{\epsilon D'} \int_0^\infty v(t)dt = \frac{Qd}{\epsilon D'} , \quad (2)$$

ahol d a töltés által megtett távolság. Az indukált töltés feltölti a mérőkör C kapacitását, amely aztán az R ellenálláson keresztül kisül. A keltett feszültség a következő:

$$V_1(t) = \frac{Q_{ind}}{C} e^{-t/RC} = \frac{Qd}{\epsilon CD'} e^{-t/RC} . \quad (3)$$

Valójában egy időben N számú töltés mozog $\rho(t)$ exponenciális időeloszlással:

$$\rho(t) = kN e^{-kt} , \quad (4)$$



ahol k a sebességi állandó. Minden egyes töltés a (3) egyenlettel leírt feszültséget kelti. Ahhoz, hogy meghatározzuk $V_N(t)$ összefeszültséget, összegeznünk kell a D távolságra levő elektródák között az N darab $V_1(t)$ függvényt minden $t' < t$ időpillanatra:

$$\begin{aligned} V_N(t) &= \int_0^t \rho(t') V_1(t-t') dt' \\ &= \frac{kNQd}{\epsilon D} \frac{R}{1-kRC} (e^{-kt} - e^{-t/RC}). \end{aligned} \quad (5)$$

A bR esetében a töltésmozgásoknak számos komponense van, különböző, egymást követő időállandókkal, ezért több exponenciális komponens is megjelenik. Ez a folyamat jól leírható a radioaktív bomlási sorozatoknál használatos Bateman függvényvel, amely az i -edik átmenetre:

$$f(k_1, k_2, \dots, k_i, t) = k_1 k_2 \dots k_{i-1} \sum_{\nu=1}^i \frac{e^{-k_\nu t}}{a_{i\nu}}, \quad (6)$$

ahol

$$a_{i\nu} = \prod_{j=1, j \neq \nu}^i (k_i - k_j), \quad (7)$$

és k_i az i -edik átmenet sebességi állandója. Az i -edik átmenetre jellemző d_i töltésmozgás tehát a mérőkörben a következő feszültséget fogja indukálni (ha $k \ll 1/RC$):

$$V_N^{(i)}(t) = \frac{NQRd_i}{\epsilon_i D} k_i f(k_1, k_2, \dots, k_i), \quad (8)$$

ahol ϵ_i a dielektromos állandó; feltételeztük, hogy a közeg izotróp minden pontban. A (8) -as egyenlet mérhető mennyiségei a $V_N^{(i)}(t)$, N , D , $f(k_1, k_2, \dots, k_i)$, az ismeretlenek pedig a d_i és ϵ_i . A továbbiakban az elmélet a dielektromos állandót a

fehérje belsejében mindenütt $\epsilon = 2$ -nek veszi, így ki lehet számolni az elmozdulások nagyságait.

A PERS elmélet rendkívüli fontossága abban rejlik, hogy a fentebb bemutatott számolások alapján lehetővé tette az elektromos jelek kvantitatív értelmezését (ezek a sebességi állandókkal és az elmozdulásokkal arányosak). Első ízben meg lehetett mondani, hogy a proton a fotociklus átmenetei alatt merre mozog és mekkora távolságokra. Nyilvánvalóvá vált, hogy a $BR \rightarrow K$ átmenet elektromos jelének az iránya ellentétes a protonpumpa irányával és az elmozdulás nagysága arra utalt, hogy ebben a lépésben Schiff-bázis protonja akkora távolságra mozdul el, amekkora a retinál izomerizálódásából adódik. A $K \rightarrow L$ átmenethez tartozó kis negatív elmozdulás valószínűleg a torzult retinál relaxációjához tartozik. Az $L \rightarrow M$ lépésre kapott elmozdulás nagysága megfelelt a Schiff-bázis és ellenionja közötti távolságnak, egyetértésben azzal, hogy a Schiff-bázis protonja az $Asp - 85$ -re kerül át. A további lépések proton elmozdulásai nagyobbak, ezekben történik a proton leadása, majd a Schiff-bázis reprotonálódása. A bR legújabb háromdimenziós szerkezeti képe szerint azonban, főként az utolsó elmozdulásokra kapott értékeket pontosítani kell. Szükséges ez azért is, mert a fehérje nem izotróp és így a dielektromos állandó értéke jelentősen változik a molekula különböző részeiben.

3. CÉLKITŰZÉS

A dolgozatban a vad típusú és mutáns bakteriorodopszinon végzett abszorpciókinetikai és fotoelektromos kísérleteinket ismertetjük. Az eredmények a fehérje működésének jobb megértéséhez vezettek.

A viszonylag jól ismert, csak *all* – *transz* retinált tartalmazó fényadaptált bakteriorodopszin fotociklusával ellentétben a 13 – *cisz* *bR* (a fehérje sötétadaptált formájában) fotociklusáról keveset tudunk. A fényadaptálás is egy részleteiben még nem ismert folyamat. Célul tűztük ki a 13 – *cisz* *bR* elektromos jelének megmérését és értelmezését is. Mivel az elektromos jelek mérésénél nincs mérőfény, az ilyen típusú kísérletek megfelelőek a sötétadaptált *bR* vizsgálatára. Az elektromos jelek kvantitatív elemzéséhez azonban szükség van a fény által a mintában előidézett abszorpciós változásokra. A fehérje köztes állapotainak a meghatározásához pedig nélkülözhetetlenek, a szintén fény jelenlétében, optikai sokcsatornás analizátorral felvett differencia spektrumok. Az említett kísérletek elvégzéséhez egy átfolyós küvetta-rendszert iktattunk be a kísérleti berendezésbe és így minden egyes mérés az előzővel azonos, újonnan bepumpált preparátumon történt. Ily módon biztosítottuk, hogy méréseink mindig a *bR* sötétadaptált formáján történjenek. A kísérleteket párhuzamosan a fényadaptált *bR* -en is elvégeztük. A sötétadaptált *bR* jeleiből levonva a fényadaptált fehérjére kapottakat, a *bR* 13 – *cisz* retinált tartalmazó fotociklusára származtak eredményeink. Továbbá, az adatokra modellt illesztve azonosítottuk azt a lépést a ciklusban, ahol nagy valószínűséggel lejátsszódik a fényadaptáció.

Számos *bR* -en végzett kutatásnak a célja a protontranszlokáció valamint a fotociklus átmeneteit kísérő töltésmozgások közvetlen mérése. A fotoelektromos jel tartalmazza az összes olyan információt amely a fehérjében, a membránra merőlegesen lejátsszó töltésmozgásokkal kapcsolatos. Ezen komplex jelek értelmezése igen nehéz a vad típusú *bR* -en, a fotociklusban megjelenő nagy számú köztes állapotok miatt. A *bR* mutánsokban azonban, bizonyos aminosavak kicserélése a fotociklus egyszerűsödését

eredményezi aminek következtében az elektromos jelek is könnyebben értelmezhetők. Ezek a mérések hasznos információkat szolgáltatnak egyes aminosavaknak a protontranszportban betöltött szerepének megértéséhez is. Továbbá, munkánk céljaul tűztük ki a fotociklus első részében lezajló töltésmozgások feltérképezését és ezek értelmezését. A *D85N* illetve *D212N* mutánsokon végzett elektromos és abszorpciókinetikai méréseinkből meghatároztuk a $BR \rightarrow K \leftrightarrow L$ átmenetek töltésmozgásait és az *Asp* – 85 illetve *Asp* – 212 csoportoknak a protonátvitelben betöltött szerepéről vontunk le következtetéseket. Egy lépéssel tovább haladva a fotociklusban, az *M* állapothoz tartozó töltésmozgásokat a *D96N* mutánson végzett kísérleteinkből határoztuk meg. Ebben a mutánsban nem alakulnak ki az *N*, *O* formák, így a fotociklus megmaradt része kinetikailag könnyebben megoldható.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. MINTAKÉSZÍTÉS

A bíbormembrán fragmentumok a *Halobacterium salinarium* S-9 -es törzséből standard eljárással készültek [5]. A sötétadaptált *bR* -en végzett optikai kísérletekben a *bm* szuszpenzió $30 \mu\text{M}$ *bR*, 100 mM NaCl és 50 mM foszfát puffert tartalmazott. A szuszpenzió pH -ját 4 és 7 között változtatva végeztük az abszorpciókinetikai méréseket. Az elektromos méréseknél az oldat pH -ja 7 volt és nem tartalmazott sót és puffert. A fényadaptált *bR* -en végzett mérésekhez a szuszpenziót egy 200 W -os higany lámpával, hő és sárga fény szűrőkön keresztül, mérések előtt és alatt is folyamatosan világítottuk.

A *Halobacterium salinarium* -ban kifejezett *D85N*, *D212N* valamint *D96N* mutánsok bíbormembrán fragmentumait J. K. Lányi (Irvine, Kalifornia) biztosította számunkra. Először ellenőriztük a *bm* -ek orientálódását sztatikus elektromos térben, [192] alapján. A mutáns membránfragmentumok ugyanolyan mértékben orientálódtak mint a vad típusú fehérje *bm* -jei. A bíbormembrán fragmentumokat poliakrilamid gélbe ágyaztuk úgy, hogy a polimerizáció időtartama alatt a preparátumra orientáló feszültséget kapcsoltunk [194]. A gél a *bR* működését nem változtatja meg, és számos előnye van a szuszpenzióhoz képest, amelyek lehetővé teszik, hogy 20 mM -nál nagyobb ionerősségeknél is végezzünk méréseket [194]. Az így kapott géleket 100 mM NaCl és 50 mM foszfát puffert tartalmazó oldatban áztattuk a mérések előtti éjszakán.

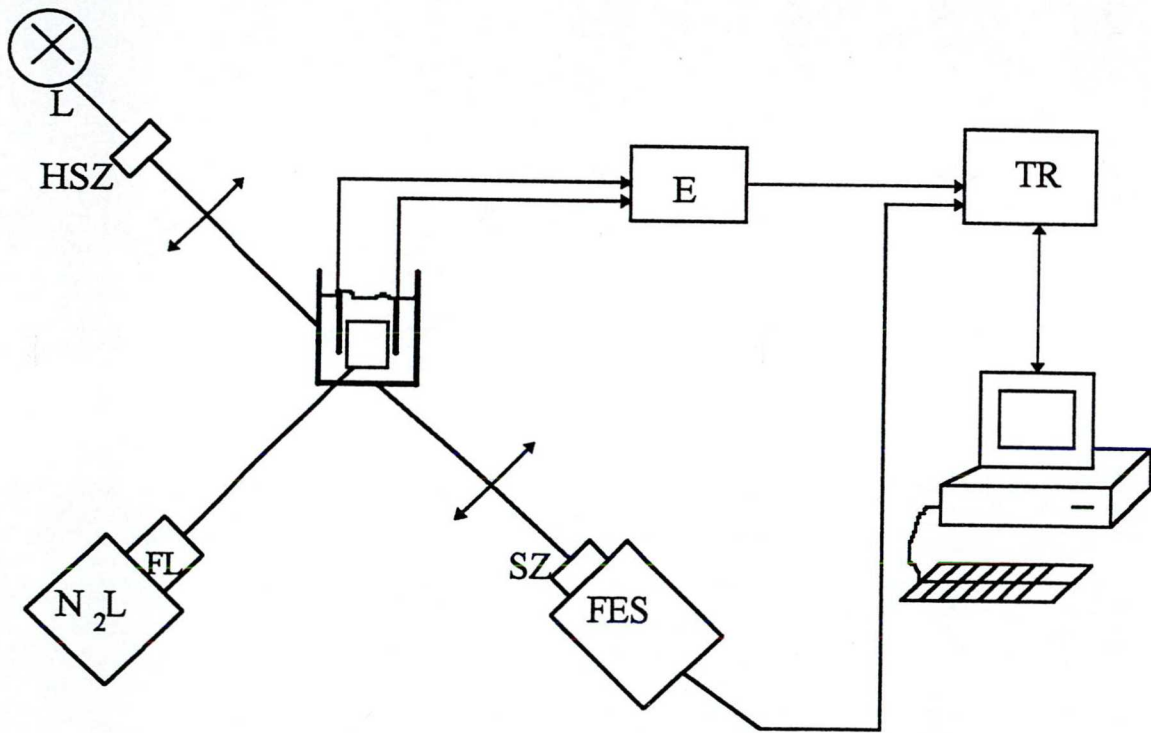
A *D212N* mutánsnál az oldat pH -ját 8 -ra állítottuk be, így biztosítva a mintában egyetlen fehérjepopuláció jelenlétét [24]. A *D85N* mutánsnál azonban, nem létezik ilyen tiszta állapot. pH 7 értéknél a fehérje lehetséges három populációjából kettő van jelen: 5% -nak az abszorpció maximuma 400 nm körül van, 95% -nak pedig 600 nm körül [195]. Az általunk használt lézer (590 nm hullámhossz) csak az utóbbi fehérje populációt gerjesztette. A *D96N* mutáns esetében az oldat pH -ját 4 és 8 között változtattuk. A *D96N* mutánsnál a fotociklus nagyon lelassul az *M* állapot kialakulása

után, a hiányzó *Asp* – 96 proton donor miatt. Azonban ezen csoport szerepét az azid átveheti, és így az *M* forma bomlása gyorsabbá tehető [181]. Ezért pH 8 -nál az oldathoz 4 *mM* azidot is adtunk, és a mennyiséget csökkentettük alacsonyabb pH -kon úgy, hogy az *M* bomlási sebessége azonos legyen az egész pH tartományban: kellően lassú ahhoz, hogy ne halmozódjanak fel az őt követő intermedierek, de elég gyors ahhoz, hogy a fotociklus lefusson 1 *s* alatt. A mutánsokon végzett mérések előtt a preparátumokat fényadaptáltuk. A pH értékeket minden egyes mérés előtt ellenőriztük.

4.2. MÉRÉSI MÓDSZEREK

4.2.1 Abszorpciókinetikai és fotoelektromos mérések

A méréseket szobahőmérsékleten (20°C) végeztük a [194,196] -ban leírt módszerrel. A stabil hőmérsékletet Peltier elemes mintatartó biztosította. A használt mérőberendezés sémája a 8. ábrán látható.



8. ábra. Az abszorpciókinetikai és fotoelektromos kísérletek mérőrendszerének vázlatja. *L* -halogén lámpa, *HSZ* -hőszűrő, *N₂L* - nitrogén lézer, *FL* -festék lézer, *SZ* -optikai szűrő, *FES* -fotoelektron-sokszorozó, *E* -erősítő, *TR* -tranziens rekorder

A mutáns *bR* orientált membránfragmentumait tartalmazó gélt küvettába helyeztük, majd a só és foszfát puffert tartalmazó oldattal öntöttük fel. A vad típusú *bR* -en végzett méréseknél a *bm* -ek szuszpenzióban voltak. A mintát egy nitrogén lézer (JATE) által pumpált házi készítésű festék lézerrel (impulzushossz 10 ns , energia $300 - 500\ \mu\text{J}$) gerjesztettük: 540 nm -en a vad típusú *bR* esetében, illetve 590 nm -en a mutánsoknál. Az adatok első felét a különböző hullámhosszakon felvett abszorpciós változások képezték, amiket egy fotoelektron-sokszorozó detektált. A mérőfény és a gerjesztő lézerfény merőlegesen voltak egymásra. A detektort megfelelően leárnyékoltuk, illetve szűrőket iktattunk be az optikai útba, így csökkentve a lézerzajt.

A fotoelektromos méréseket a [194,196,197] alapján végeztük. Az elektromos jeleket az oldatba merülő, platinakorommal bevont platina elektródákkal mértük, és házi készítésű erősítővel erősítettük fel. Az adatgyűjtést számítógép által vezérelt tranziens rekorder (Thurbly DSA 524) végezte. Ahhoz, hogy a fotociklus egész időtartamára jó időfelbontással végezzük el a méréseket, 3-4 növekvő lineáris időalappal kellett az adatokat gyűjteni. Az adatokat számítógépbe olvastuk át és ott átlagoltunk. Mindezekhez egy, az intézetben kifejlesztett mérőprogramot használtuk.

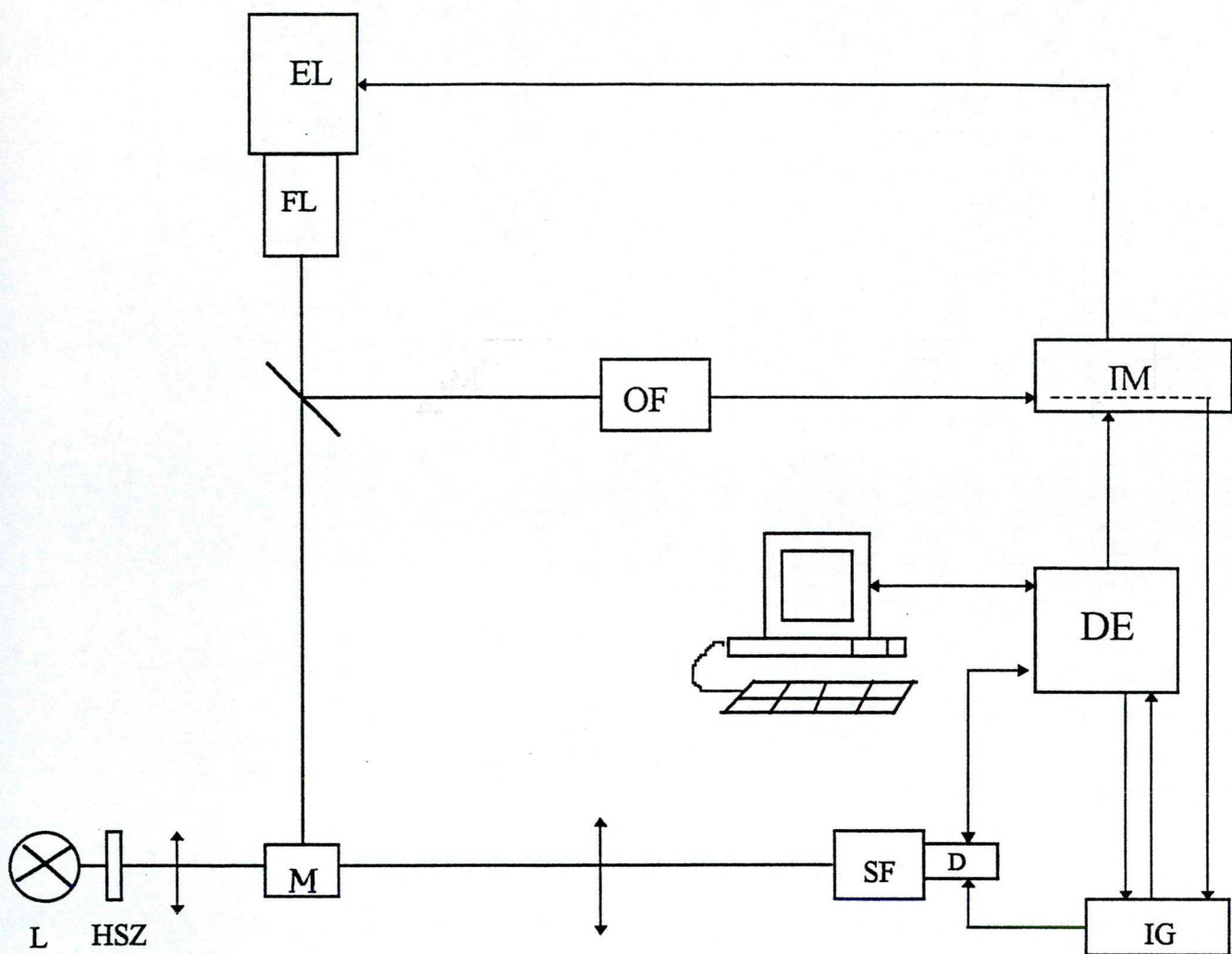
A sötétadaptált *bR* -en végzett kísérletekben bizonyos kiegészítő elemeket kellett beiktatnunk a mérőrendszerbe. Itt egy házi készítésű, átfolyós küvettát használtunk, amely a mérésindító jellel szinkronizáltan, minden egyes mérés után új anyagot pumpált be az 1 l -es tartályból a kb. 0.4 ml -es küvettába. Ily módon biztosítottuk, hogy a mérések alatt a küvettában mindig a tartályban levővel azonos minta legyen: sötétadaptált vagy fényadaptált *bR* szuszpenzió. Az elektromos mérések esetében a $2 \times 15 \times 10\text{ mm}$ -es küvettába három elektródát merítettünk. A szuszpenzióra $15 - 20\text{ V/cm}$ -es orientáló feszültséget kapcsoltunk 0.5 s -ig, úgy, hogy a középső elektródát a pozitív, a két külsőt pedig a negatív pólusra kötöttük. Ezáltal a küvetta két felében a minta ellentétesen volt orientálva. A fotoelektromos jelet a két szélső elektródán mértük, 5 ms -al az orientáló feszültség kikapcsolása után. A lézernyaláb csak a küvetta egyik felét érte és a két fél küvetta ellentétes orientálása miatt az

egyéb hatásokból fakadó áljelek kiátlagolták egymást. Az így kapott elektromos jel a minta gerjesztett felében lezajló fotociklust kísérő töltésmozgások összegeként jelenik meg. A küvettát hozzá kapcsoltuk az előzőekben leírt, új anyagot pumpáló rendszerhez. Az elektromos jelek miliszekundumokig stabilnak bizonyultak, de hosszabb időknél lassú alapvonal csúszások jelentek meg, ezért ebben az időtartományban a jelek nem értelmezhetők.

4.2.2 Optikai sokcsatornás analizátorral végzett mérések

Az optikai sokcsatornás analizátorral (OSMA) végzett kísérleteink az [53] -ban leírt módszer alapján történtek. Az egyetlen változtatás a mérésindító jellel szinkronizált átfolyós küvetta rendszer beiktatása volt, amivel ebben az esetben is biztosítottuk, hogy a 13 – *cisz* fotociklus meghatározásához végzett méréseink sötétadaptált, illetve fényadaptált *bR* -en történjenek. A használt mérőrendszer vázlata a 9. ábrán látható.

A gerjesztő lézer nyalábra merőleges mérőfényt egy halogén lámpa (250 W) biztosította. A mintát excimer lézer (JATE) által pumpált festék lézerrel gerjesztettük. Festékként a *Coumarin 153* -at használtuk, aminek a maximális emissziós hullámhossza 540 nm. A minta után lencsékkel fókuszáltuk a fényt a spektrofotométer bemenő részéhez. A spektrumot detektor érzékeli, aminek fő alkotó elemei egy kapuzott gyors diódasor (512 dióda) és egy nagyfeszültséggel vezérelt képerősítő. A képerősítőre kapcsolt nagyfeszültség időzítésével szabályozható, hogy a diódasor mikor és milyen hosszan érzékeli a ráeső fényt. A detektor egy ellenőrző egységhez van kötve, a kapuzását pedig a hozzá kapcsolt impulzus generátor végzi. Az utóbbi által kibocsájtott kapuzó jel időtartama alatt a detektor a fényintenzitással arányos jeleket érzékeli egy széles hullámhossz tartományban. Hosszabb időképletetéseknél külső impulzus generátort használtunk.



9. ábra. Az optikai sokcsatornás analizátorral (OSMA) végzett méréseknél használt kísérleti berendezés vázlata. L -halogén lámpa, HSZ -hőszűrő, M -minta, EL - excimer lézer, FL -festéklézer, OF -optikai fényérzékelő, IM -impulzus manipulátor, SF -spektrofotométer, D -OSMA detektor, IG -impulzus generátor, DE -OSMA detektor ellenőrző

A kapuzó jelek hosszát úgy változtattuk, hogy optimális jel/zaj viszonyt érjünk el, ugyanakkor eléggé rövidek legyenek az időkéseletetés tartamához viszonyítva. Az utóbbi a gerjesztés és a kapuzó jel közepe közötti időtartam. A mérések időzítését házi készítésű impulzus manipulátor biztosította, amely TTL jeleket bocsájt ki a lézer és az impulzus generátorok elindításához. A mérés indító jelet a detektor ellenőrző adja. Ezt követően a lézer gerjeszti a mintát és egy optikai fényérzékelő indítja az impulzus generátorokat. Ezek kiadják a kellő hosszúságú jelet a beállított időkéseletetéssel és a detektor érzékeli a lézer által a mintában okozott fényintenzitás változásokat. Az időfelbontás a fotodiódák fizikai paramétereitől és a nagyfeszültséget kapcsoló elektronikától függ. A jel/zaj viszonyt a diódákat érő fotonok száma határozza meg és ez az arány jelentősen javítható átlagolással. Az adatgyűjtést számítógép végezte. Minden egyes időkéseletetésnél az adatgyűjtés párhuzamosan történt gerjesztés hiányában is, így határozva meg a fehérje köztes állapotainak spektruma mellett az alapállapot abszorpciós spektrumait is. Mivel a jeleket egyidőben mértük, a lámpa intenzitásában megjelenő lassú változások valamint a minta fényszórás változása nem torzították a jeleket. A kétféle adatsorból pedig megkaptuk a gerjesztett fehérje, alapállapothoz viszonyított differencia spektrumait 350 – 750 nm hullámhossz tartományban. A spektrumokat a gerjesztést követően 28 növekvő időpontban vettük fel, az elsőt 400 ns-al a gerjesztés után. Ugyanazt az oldatot (de a *bm* -eket nem) tartalmazó küvetát használva, felvettük a lámpa fényének intenzitását. Ily módon ki lehetett számolni a minta abszolút spektrumát. Egyébként a kísérletek az abszorpciókinetikai mérésekkel azonos körülmények között történtek.

4.3. MÉRÉSI ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

Az abszorpciókinetikai és elektromos adatok lineáris időalapját logaritmusossá konvertáltuk, egy az intézetben kifejlesztett programmal. Az algoritmus átalakítja a lineárisan egyenlő távolságokra levő pontokból álló egymást követő méréseket logaritmikusan egyenlő távolságra levő 20 ponttá nagyságrendenként, úgy, hogy átlagolja a köztes adatokat. Az adatok ilyen szerű átlagolása javítja a jel minőségét, a logaritmusos időalap pedig megkönnyíti a meglehetősen széles időtartományban ($100 \text{ ns} - 1 \text{ s}$) lejátszódó folyamatok ábrázolását.

Az OSMA -val mért differencia spektrumok, valamint bizonyos hullámhosszaknál felvett abszorpcióváltozások, a fény hatására a fehérjében kialakuló köztes állapotokról és a köztük levő átmenetekről tartalmaznak információkat. A fotociklus időállandóinak meghatározásához azonban, első lépésként a spektrális változásokat át kell számolni az intermedierek koncentrációinak az időfüggésévé [147]. Ezáltal a mért, látszólagos sebességi állandók helyett a számolások eredményeképpen kapott mikroszkópikus, valós sebességi állandókkal dolgozhatunk tovább. Az abszorpcióváltozás a következő szorzatként írható fel:

$$\Delta A_{\lambda}(t) = \sum_i \epsilon_{\lambda}^i C_i(t) , \quad (9)$$

ahol $\Delta A_{\lambda}(t)$ az abszorpcióváltozás oszlop mátrixa hullámhossz szerint változó elemekkel, ϵ_{λ}^i a köztes formák extinkciós együtthatóinak mátrixa és $C_i(t)$ a fotociklusban megjelenő intermedierek koncentrációiból álló oszlop mátrix.

Az extinkciós együtthatókat a *D212N* és *D85N* mutánsok köztes állapotainak spektrumaiból határoztuk meg [24,198] alapján, illetve a *D96N* mutáns esetében [59] szerint. Ezekkel az adatokkal a (9) egyenletből ki lehetett számolni a köztes formák időbeli koncentrációváltozásait. A következő lépésben fotociklus modellt il-

lesztettünk a koncentrációk időfüggésére, aminek eredményeképpen megkaptuk az átmenetek mikroszkópikus időállandóit. Az illesztő programok alapját az [58] dolgozatban leírt módszer képezte.

Elektromos szempontból a membránokat egy egyszerű ellenállás-kapacitás (RC) körrel írhatjuk le, amelyben a C kapacitást a bm -ek alkotják és ezeket az R ellenállás, azaz az oldatban levő ionok sűtik ki. Ez egy RC relaxációs időállandót eredményez. A bm -ek kapacitása jó megközelítéssel egy állandó mennyiség, de az R értéke nagy mértékben függ a kísérleti körülményektől, főként az ionerősségtől. 1 mM ionerősség fölött a bm -ek vizes szuszpenzióján illetve gélbe ágyazott mintáin mért elektromos jelek ettől a relaxációtól mentesek, mivel az RC relaxációs ideje rövidebb az L , M , N , O formák kialakulásánál [82,94]. Mitöbb 10 mM -nál nagyobb ionerősségeknél az RC relaxációs ideje $< 1 \mu s$ [94]. Csak jóval alacsonyabb ionerősségeknél jelennek meg interferenciák a $K \rightarrow L$ átmenet töltésmozgásaival [82,94].

A mi kísérleti körülményeink között a mérőrendszert egy egyszerű, 6×10^{-8} s körüli időállandóval rendelkező RC körrel helyettesíthetjük.

A PERS elmélet alapján az elektromos jelekből következtetni lehet a töltésmozgás irányára és ha a dielektromos állandót a membránon belül $\epsilon = 2$ -nek feltételezzük, az elmozdulás nagyságai is meghatározhatók. A bR szerkezeti képéből azonban nyilvánvalóvá vált, hogy a fehérje belsejében hidrofób, illetve hidrofil részek egyaránt megtalálhatók [11]. Ezért nagyon valószínű, hogy ezeken a helyeken a dielektromos állandók különböznek. Mivel ezek értékeit még nem határozták meg, a fenti feltételezést kiküszöbölendő, munkánkban a töltésmozgások leírására a [82] -ben értelmezett elektrogenicitási együtthatókat (továbbiakban röviden elektrogenicitás) használtuk. Ezek a mennyiségek definíciószerűen tartalmazzák a lokális dielektromos állandókat és az alapállapothoz viszonyított relatív dipólusnagyságot határozzák meg [82], amint azt a következőkben tárgyalom.

A j -ik intermedier dipólusnagysága így írható fel:

$$D_j = A \sum_i \mu_{ji}(\epsilon) , \quad (10)$$

ahol A az orientáció fokát mérő konstans, μ_{ji} a fehérjében levő dipólus momentumok. Ezek a töltés disztribúción kívül, ϵ -tól azaz a fehérje dielektromos tenzorától is függnnek. Az intermedier elektrogenicitása:

$$E_j = D_j - D_0 , \quad (11)$$

ahol D_0 az alapállapot dipólusnagysága. Az elektrogenicitás változása által a mérőrendszerben indukált elektromos áram:

$$i(t) = B \sum_j E_j \frac{dC_j}{dt} , \quad (12)$$

ahol B az áramkör által meghatározott konstans és C_j a j -ik köztes forma koncentrációja. A (12) egyenletből kitűnik, hogy ha egy forma nem alakul ki, vagy a koncentrációja konstans marad a fotociklus során, nincs indukált árama. Azoknak az intermediereknek, amelyek olyan gyorsan bomlanak, hogy nem halmozódnak fel a fotociklus során, szintén nincs elektromos jelük. Mivel a fehérje töltöttsége jelentősen függ a külső körülményektől (pH, ionerősség), a köztes állapotok elektrogenicitásai is függhetnek ezektől.

Ha kizárólag irreverzibilis reakciókat tartalmazó fotociklus modellel számolunk, a fentiek alapján az i -edik átmenet eltolódási árama arányos az $(E_{i+1} - E_i)$ különbséggel, amit a PERS elméletben az elmozdulás nagyságaként (d_i) ismerünk. Ez a mennyiség megfelel az irreverzibilis reakciósort kísérő töltésmozgások leírására, de nem az

elágazásokat, vagy oda-vissza reakciókat tartalmazó modellek analízisére. Ilyen esetekben az állapotok elektrogenicitásait kell meghatározni [82].

Az elektromos jelek első, gyors komponense, melyet a kezdeti töltésszétválásnak, azaz a retinál izomerizációjának tulajdonítanak, negatív, a későbbi protontranszport irányával ellentétes a vad típusú bakteriorodopszinban [92,193]. Mivel az elektromos méréseinkből származó áramjel ezekhez hasonló volt, azt a hipotézist használtuk a mutánsoknál, hogy az izomerizációból származó jel mindig ugyanakkora, azaz a mutáció a retinál közvetlen környezetét nem változtatta meg. Számolásainkban ezen első jel relatív elektrogenicitását -1 -nek vettük. Az időben következő jeleket pedig hozzá normáltuk.

Az abszorpciókinetikai mérésekből kapott időállandókkal illesztve a fotoelektromos jeleket, a fehérjében lezajló töltésmozgásokra származtak információink, ugyanis (amint azt már az előbbieken láttuk) ezek a jelek az elektródák között történő töltésmozgások által indukált áramként jelennek meg. A mért jel idő szerinti integráljában jól követhetők azok a lassú, de jelentős töltésmozgások, amelyek egyébként nagyon kis áramot indukálnak. Ezeket is minden esetben az árammal egyidőben illesztettük az abszorpciókinetikai mérésekből meghatározott kinetikai paraméterekkel.

A 13 – *cisz* retinált tartalmazó *bR* fotociklusának (továbbiakban röviden 13 – *cisz* fotociklus) meghatározásához a kísérleteket elvégeztük a sötétadaptált, illetve fényadaptált fehérjén egyaránt. Az abszorpciókinetikai méréseknél a pH -t 4 és 7 között változtattuk, abban a tartományban ahol nem alakul ki *M* forma [47]. A sötétadaptált *bR* jeleiből kivontuk a fényadaptált molekula egy faktorial szorzott jeleit oly módon, hogy az *M* -nek megfelelő, 410 nm körüli jel eltűnjön. Eredményként a 13 – *cisz* fotociklusnak megfelelő jeleket kapjuk meg. A számolásokban elfogadtuk azt a megfigyelést, hogy a fényadaptált *bR* -ben a retinál teljes egészében *all* – *transz* állapotban van [36]. Az így kapott 13 – *cisz* fotociklus OSMA differencia spektrumait sajátérték probléma (SVD) analízissel tanulmányoztuk tovább a [199] -ben ismertetett SPSEV program-

mal. Ugyancsak ezzel a programmal végeztük a kinetikák globális illesztését is. Az SVD számolások lényege az, hogy meg kell határozni azt a két unitér mátrixot, melyek egy tetszőleges mátrixot átlóssá transzformálnak [200]. Az átlón levő elemek az eredeti mátrix sajátértékeit képezik. Az általános probléma egyik gyakorlati alkalmazása az, hogy a spektrumokat jelentősen mentesíteni lehet a zajoktól. A mért komplex spektrumok jól meghatározott amplitúdókkal rendelkező komponens spektrumokra bonthatók. Az utóbbiakból pedig elhagyva azokat amelyeknek nincs struktúrájuk, rekonstruálni lehet az eredeti spektrumok zajszűrt megfelelőit [201,G4].

5. EREDMÉNYEK ÉS EZEK ÉRTELMEZÉSE

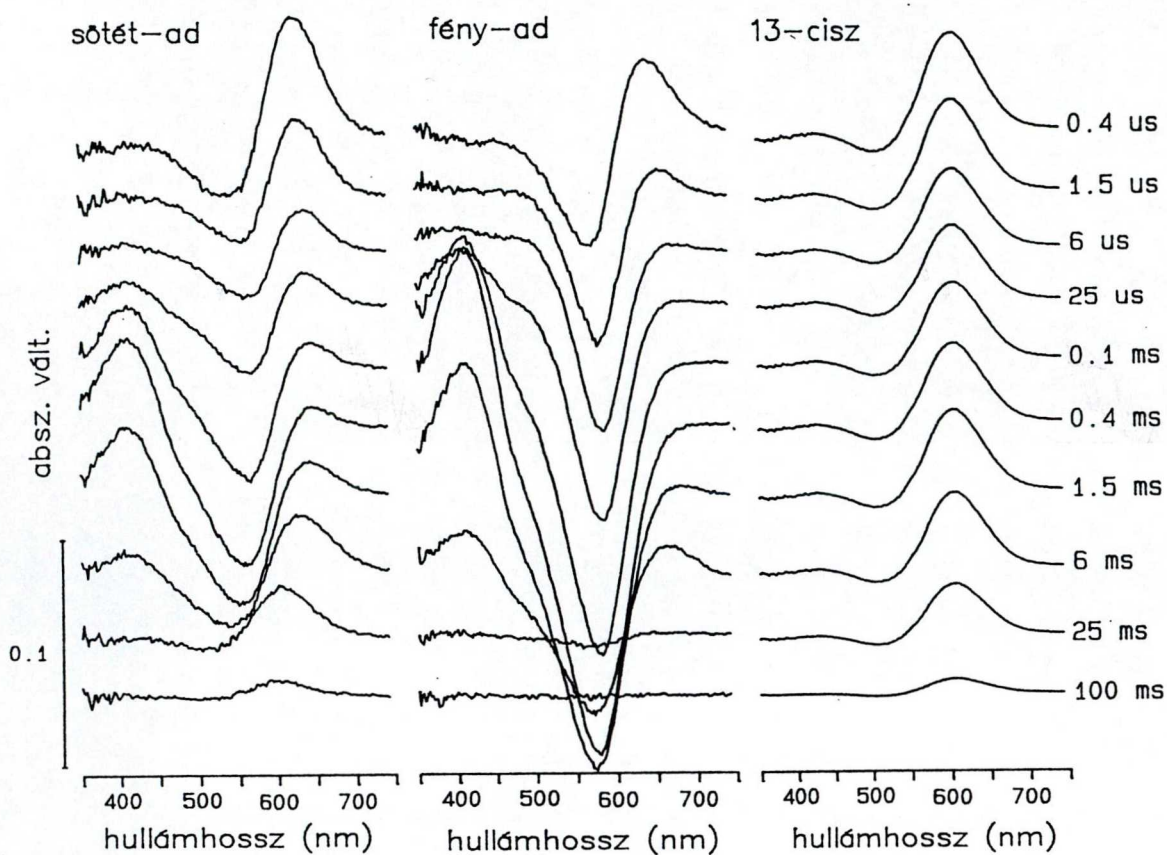
5.1. A 13 – CISZ BAKTERIORODOPSZIN FOTOCIKLUSA

5.1.1. A 13 – *cisz* bakteriorodopszin OSMA differencia spektrumai

pH 7 -en, a gerjesztés után 28 időpontban mért OSMA differencia spektrumokból tízet a 10. ábrán mutatunk be. Mérések közben időnként ellenőriztük a minta stabilitását úgy, hogy felvettük az alapállapotban levő sötét- illetve fényadaptált *BR* abszolút spektrumát. Ezek mindvégig változatlanok maradtak, attól függetlenül, hogy az OSMA -val, vagy a Shimadzu UV-Vis 160 spektrofotométerrel mértük őket.

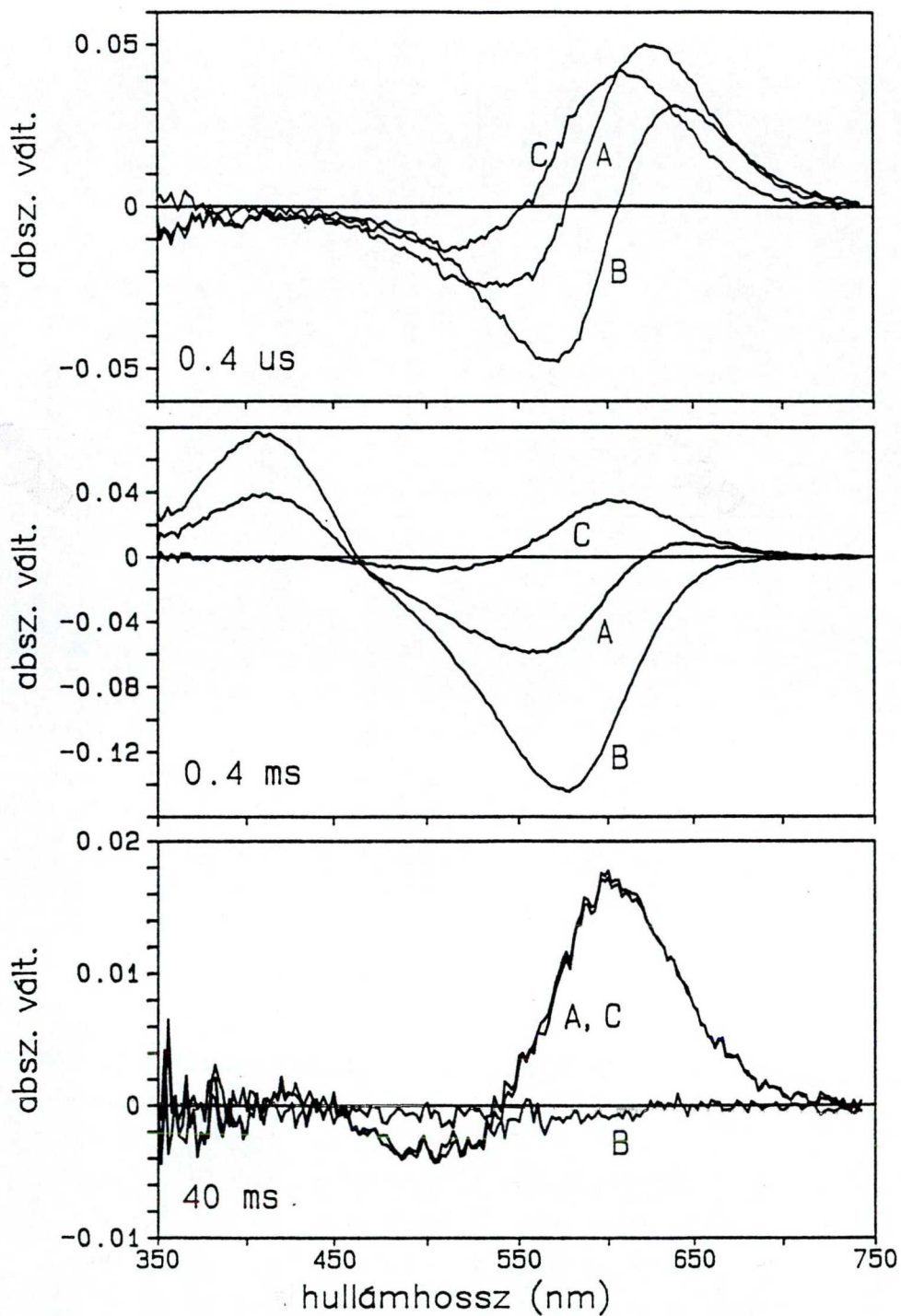
A differencia spektrumok komplex változásokat mutatnak a fehérje mindkét állapotában a mért időtartományban (10. ábra, első két oszlop). A sötétadaptált *bR* jeleiből úgy vontuk ki a fényadaptált fehérje jeleit, hogy a 410 nm körüli, *M* formának megfelelő csúcs eltűnjön. Ahhoz, hogy ezt el tudjuk végezni, a fényadaptált *bR* jeleit meg kellett szorozni 0.52 -vel. Ez azt jelenti, hogy a sötétadaptált fehérjében a retinál izomér formáinak 13-*cisz* : *all-transz* aránya körülbelül 1 : 1. Ez az érték megegyezik a [41] -ben megadottal. Habár későbbi mérések szerint ez az arány inkább 3 : 2 [37], az, hogy a fehérjében a retinál milyen állapotban van, jelentősen függhet a hőmérséklettől, pH -tól, ionerősségtől és más kísérleti körülménytől is [36]. Ezért az általunk kapott arány megfelelőnek bizonyult.

A 11. ábrán a sötét- illetve fényadaptált *bR* differencia spektrumait mutatjuk be a gerjesztést követő három különböző időpontban, valamint azok normált különbségét: a 13 – *cisz* fotociklusnak megfelelőket.

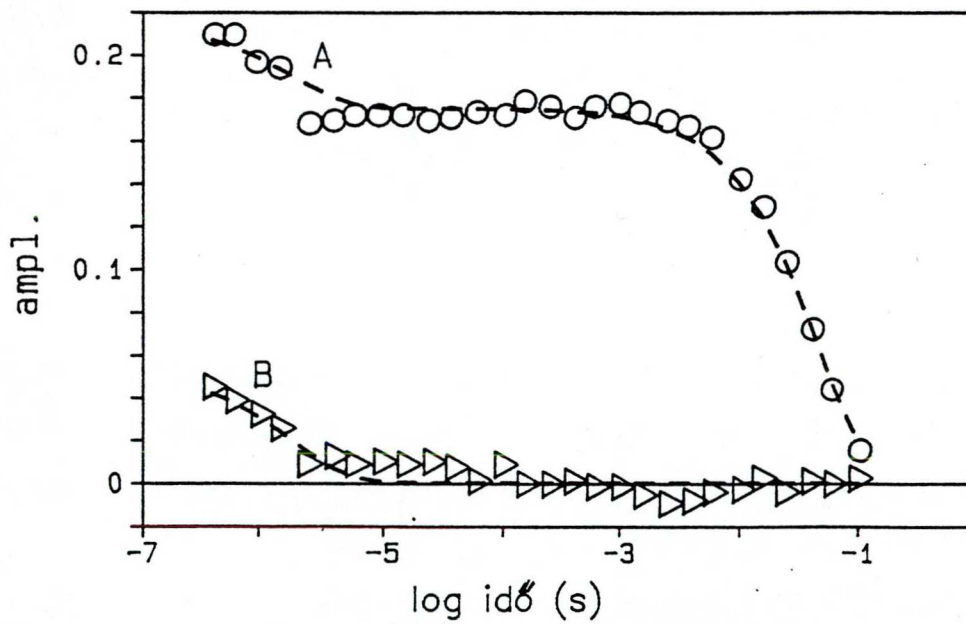
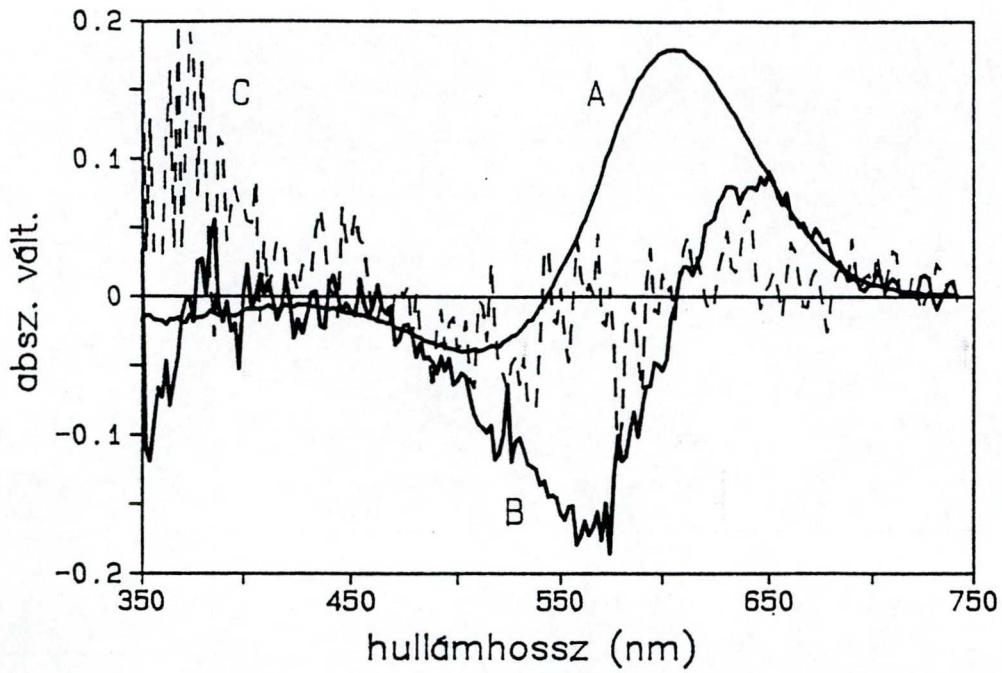


10. ábra. OSA differencia spektrumok a gerjesztést követő különböző időkéleltetések után. Az első oszlopban a sötétadaptált-, a másodikban a fényadaptált bR differencia spektrumai láthatók. A harmadik oszlopban ábrázoltuk a 13 - cisz fotociklus SVD szűrt differencia spektrumait.

A 11. ábrán jól látható, hogy a kivonás eredményeként kapott spektrumok eléggé zajosak. Ezen differencia spektrumok SVD analízise két domináns összetevő spektrum létezését bizonyította: az egyik 0.97 -es, a másik 0.07 súlyfaktoral. A spektrum felbontás többi komponensének súlyfaktora 0.03 alatt van és ezek gyakorlatilag csak a zajt tartalmazzák.



11. ábra. A sötét-, illetve fényadaptált bR differencia spektrumai három különböző időképletetésben (A illetve B spektrumok) és ezek különbsége miatt a fényadaptált fehérje spektrumát 0.52-es faktorról normáltuk (C spektrum). Az utóbbiak a 13 - cisz bR fotociklusának felelnek meg.



12. ábra. Az SVD analízissel meghatározott első (A), második (B) és harmadik (C) komponens spektrumok - felső ábra. A két első komponens súlyozott amplitúdóinak az időfüggése - az alsó ábra szimbólumai. A szaggatott vonalak az amplitúdók két exponenciálissal való illesztését mutatják.

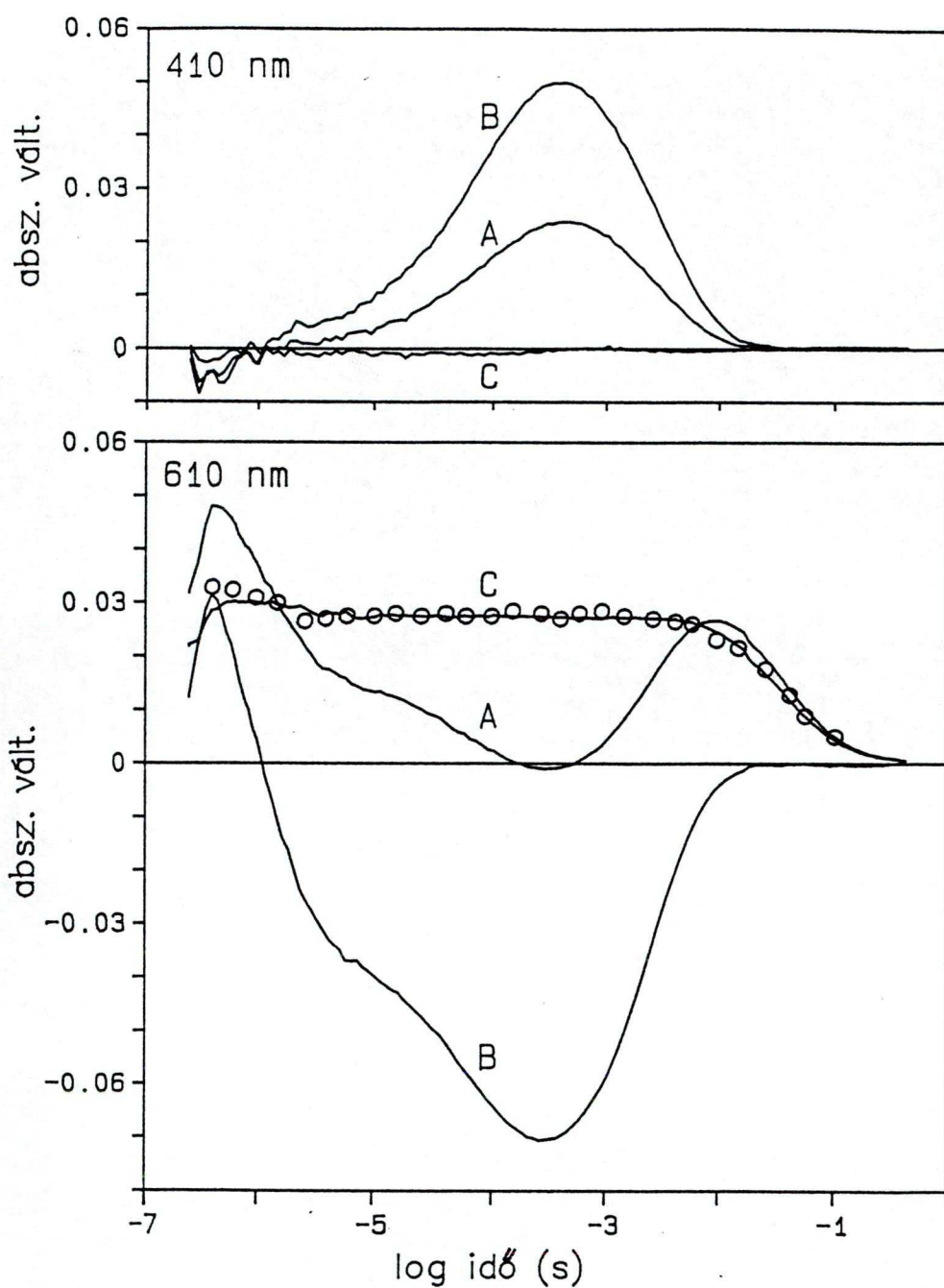
Ugyanakkor, míg a két első komponens amplitúdóinak időfüggése folytonos, a többieknek nincs zajon kívüli struktúrájuk. A főbb összetevő spektrumokat és azok amplitúdóit a 12. ábrán mutatjuk be.

A két fő összetevő spektrummal és ezek súlyozott amplitúdóival számolva [200], jelentős zajszűrést értünk el a 13 – *cisz* fotociklus rekonstruált differencia spektrumaiban (10. ábra, harmadik oszlop). Ezek a spektrumok kevésbé változnak mikroszekundumokig, de 10 *ms* után a 600 *nm* körüli jellegzetes váll kezd eltűnni. A két komponens spektrum súlyozott amplitúdóit egyidőben illesztettük két exponenciálissal (12. alsó ábra). A folyamatok időállandóira az $1.9 \pm 0.5 \mu s$ és $46 \pm 4 \text{ ms}$ értékeket kaptuk. A hosszú életidejű forma létezését már több mérés során kimutatták [39,202], de egy rövidebb 2 μs életidejű intermedierről mostanig csak az [51] -ben írtak.

5.1.2. A 13 – *cisz* fotociklus kinetikája 610 *nm* -en

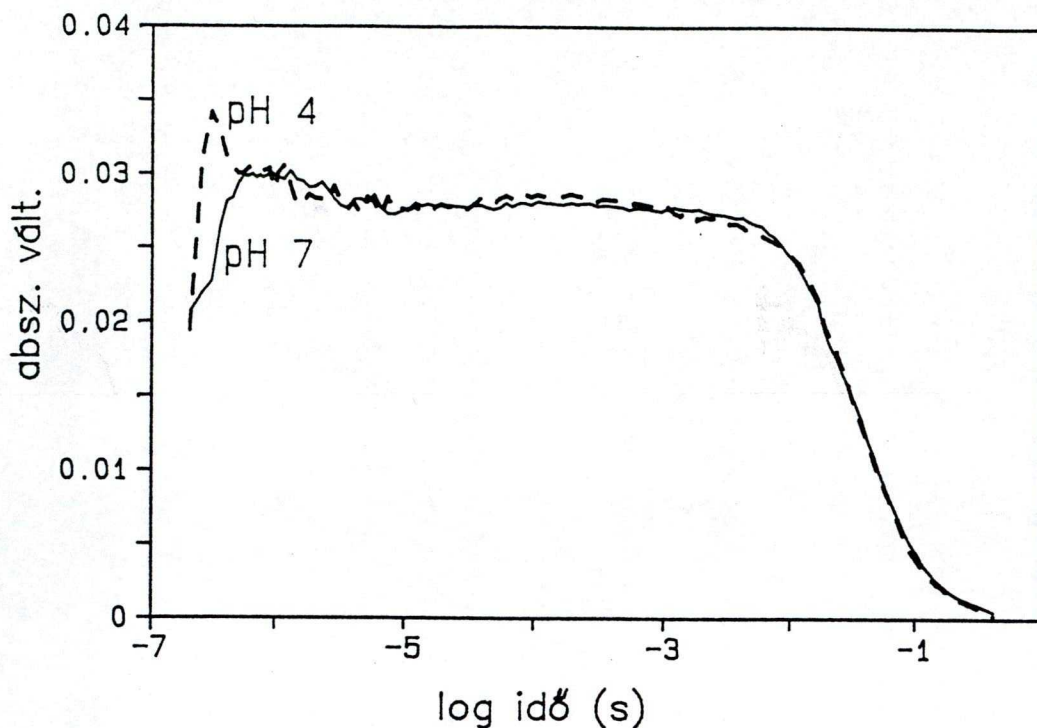
Az abszorpciókinetikai méréseket két hullámhosszon végeztük. A 410 és 610 *nm* -en mért abszorpcióváltozások a 13. ábrán láthatók.

Ezekből a mérésekből határoztuk meg a 13 – *cisz* fotociklus kinetikáját 610 *nm* -en. 0.5 ± 0.03 normálási faktorialkal számolva, a sötédadaptált- és fényadaptált *bR* jeleit kivontuk egymásból, és ennek eredményeképpen a 410 *nm* -en mért abszorpcióváltozás nullázódott (13. ábra, 410 *nm*, C görbe). Ez azt mutatja, hogy a fehérje mindkét állapotában az *M* forma kinetikája azonos, azaz a mi mérési körülményeink között valóban csak az *all – transz* retinált tartalmazó *bR* fotociklusában alakul ki ez a köztes állapot. A 13 – *cisz* fotociklusnak megfelelő kinetikát, 610 *nm* -en a C görbe mutatja (13. ábra, 610 *nm*). A görbén megjelenő szimbólumok ábrázolják az OSMA differencia spektrumokból ezen a hullámhosszon, különböző időpontokban leolvasott és egy pontban normált maximumokat. Jól látható, hogy mindkét mérési módszer azonos kinetikákat eredményezett. A jelek ebben az esetben is jól illeszthetők voltak két exponenciálissal. A folyamatok időállandói a következők: $1.5 \pm 0.4 \mu s$ és $52 \pm 4 \text{ ms}$.



13. ábra. Két hullámhosszon végzett abszorpciókinetikai mérések a sötétadaptált és fényadaptált bR -en (A, illetve B görbék). Normált különbségüket, azaz a 13 – cisz fotociklusnak megfelelő kinetikát a C görbe ábrázolja. A szimbólumok az OSMA differencia spektrumok megfelelő maximumait jelzik.

Az abszorpciókinetikai méréseket pH függvényében is elvégeztük, a pH -t 4 és 7 között változtatva, de a kinetika nem változott (14. ábra).



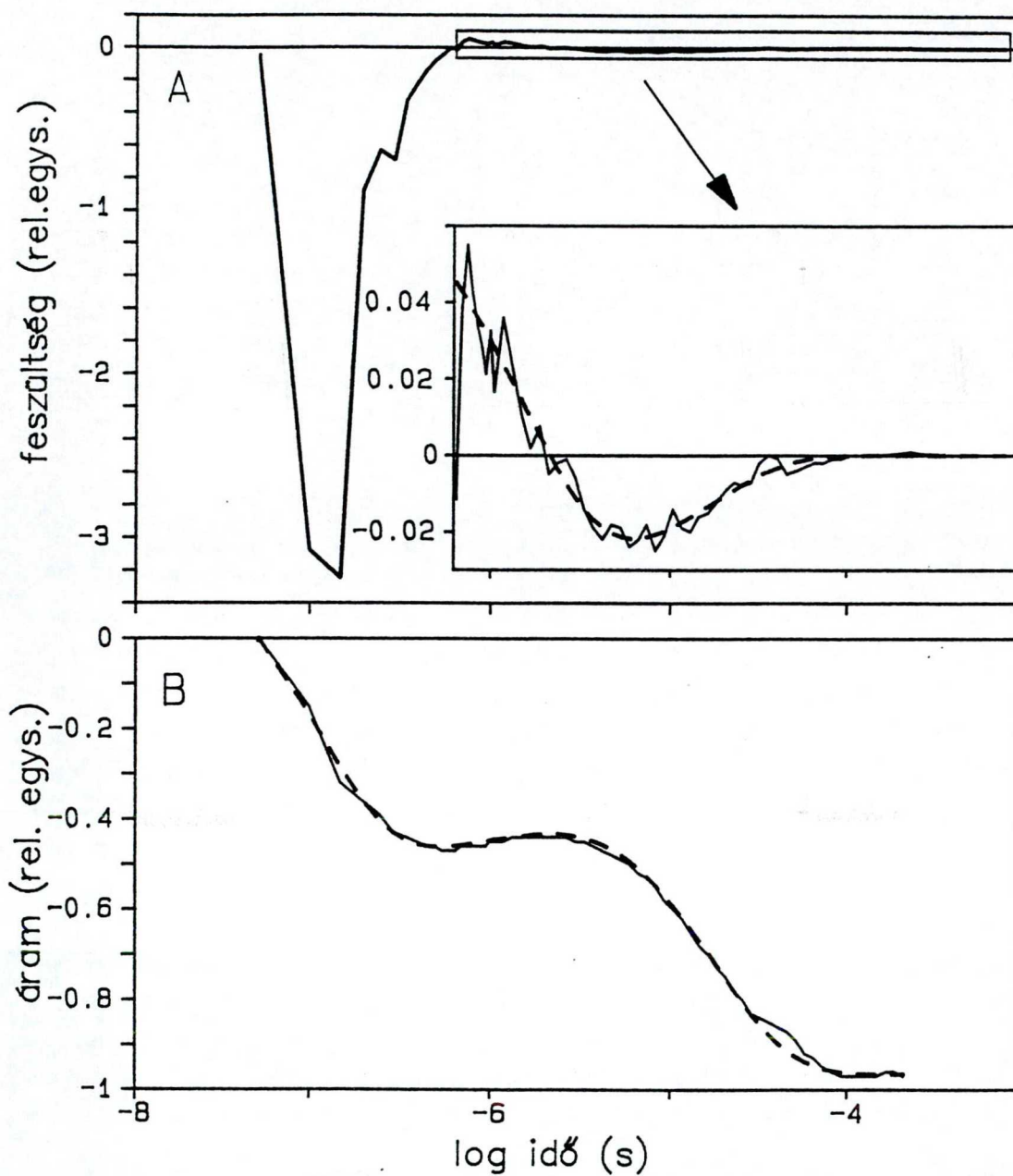
14. ábra. A 610 nm -es hullámhosszon mért abszorpciókinetikai jelek normált különbsége pH 4 és 7 értékeknél.

Ebben a pH tartományban tehát, a 13 – *cis*z fotociklusban lejátszódó folyamatok pH függetlenek. Ezzel ellentétben, az *all* – *transz* fotociklusban a 410 nm -en mért *M* forma kinetikája változik a pH -val [72]. Mi több, a 610 nm -en mért jeleknek nemcsak a kinetikája, de a formája is változik a pH -val, ugyanis a pH csökkentésével egyre jobban felhalmozódik az *all* – *transz* fotociklus *O* állapota [72].

5.1.3. A 13 – *cisz* fotociklus fotoelektromos jelei

A fotoelektromos méréseket pH 7 -en végeztük, és a szuszpenzió nem tartalmazott sókat és puffert. Ilyenkor figyelembe kell venni azt a tényt, hogy só hiányában a membrán felületénél levő lokális pH alacsonyabb az oldatban mért pH -nál [7], de amint azt az előbbiekben láttuk, a folyamatok pH függetleneknek bizonyultak. Ahhoz, hogy az elektromos jeleink kiértékelhetőek legyenek, abszorpciókinetikai méréseket is végeztünk azonos körülmények között, és ezek a jelek megegyeztek azokkal, amelyeket só és puffer jelenlétében mértünk.

A sötétadaptált *bR* elektromos jeléből kivontuk az előzőekben meghatározott faktorról normált, fényadaptált *bR* -nek megfelelő jelet. A kivonás eredményeképpen kapott elektromos jel (15. ábra) a 13 – *cisz* fotociklusban lezajló töltésmozgásokból származik. Az áram jelében megjelenő gyors negatív komponenst egy pozitív csúcs követi, mely a 15.A. ábra kinagyított részében látható módon, egy újabb negatív csúcson keresztül cseng le. Az áram integrálja is jól mutatja az elektromos jel változásait (15.B. ábra). A jeleket két exponenciálissal illesztettük (15. ábra, szaggatott vonal); a kapott időállandók: $1.5 \pm 0.6 \mu s$ és $17.5 \pm 2 \mu s$. Az elektromos jelben megjelenő hosszabb időállandójú ($17.5 \pm 2 \mu s$) komponensnek nem volt megfelelője az optikában.



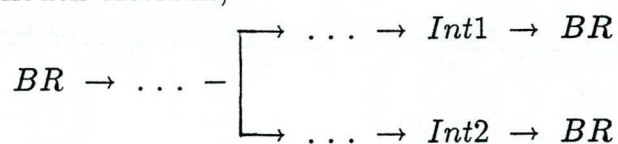
15. ábra. A 13 – cisz fotociklusnak megfelelő elektromos jelek: az áram (A) és az integrálja (B) -folytonos vonalak; valamint két exponenciálissal történő illesztésük -szaggatott vonal.

5.1.4. Az eredmények értelmezése: a 13 – *cis*z bakteriorodopszin fotociklusa

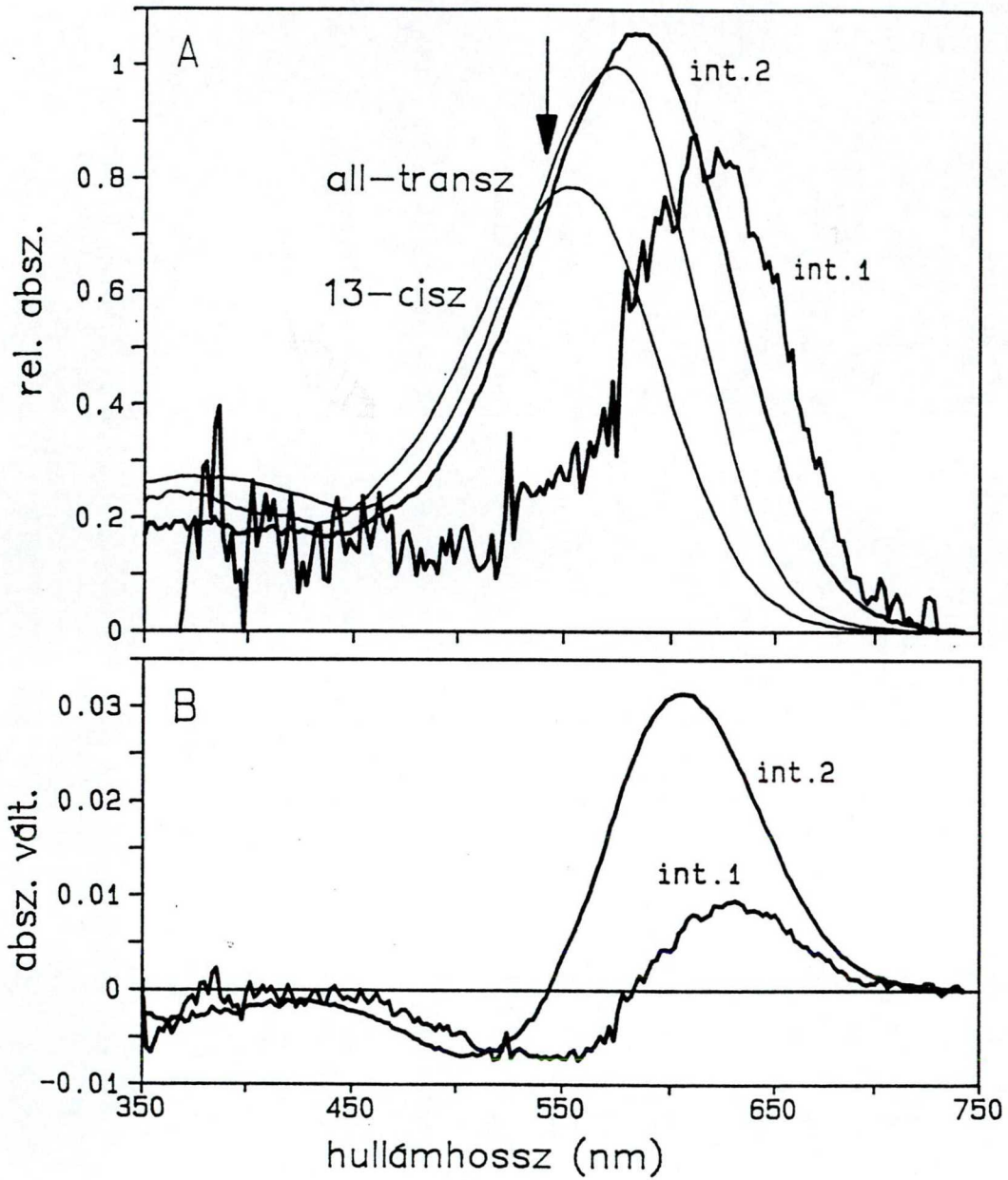
A 13 – *cis*z retinált tartalmazó *bR* fotociklusáról csak néhány dolgozat jelent meg [39,203]. Az ezekben javasolt fotociklusban kialakul egy *K* -szerű köztes forma, amely nagyon gyorsan bomlik. -90°C hőmérsékleten ez a forma átalakul kevesebb mint $0.5 \mu\text{s}$ alatt egy hosszú életidejű *O* -szerű állapottá, amely 40 ms alatt cseng le 20°C -on. Az utóbbi köztes termék abszorpciós maximuma 610 nm . Később, új időfelbontásos differencia spektrum mérések SVD analízise azonban azt mutatta, hogy legalább három köztes állapot létezik a 13 – *cis*z fotociklusban [51]. Optikai és elektromos méréseink új eredményeket szolgáltatottak az említett kérdéskörök tisztázásához.

A 13 – *cis*z retinált tartalmazó bakteriorodopszin OSMA differencia spektrumainak SVD analízise két köztes forma létezését mutatta ki a mért időintervallumban (12. ábra). OSMA és abszorpciókinetikai mérések egyaránt bizonyították, hogy ezek $1.7 \mu\text{s}$ illetve 50 ms körüli időállandókkal bomlanak. A folyamatokat modellezhetjük egy korai elágazást követő két párhuzamos reakcióssal, illetve egy szekvenciális modellel. A két komponens spektrumból és ezek amplitúdóiból vissza lehet nyerni a köztes állapotok modellfüggő differencia spektrumait. Ha ezekhez hozzáadjuk a 13 – *cis*z *bR*, OSMA mérésekből kapott abszolút spektrumát (16.A ábra), akkor a köztes formák abszolút spektrumait is meghatároztuk. A számolások során a lézer által okozott gerjesztés relatív értékét is megkapjuk, amint az a módszer lényegét ismertető [100] dolgozattól is kitűnik. A fényadaptált fehérje differencia spektrumai arra utalnak, hogy a *bR* molekuláknak körülbelül $19 \pm 1\%$ -a gerjesztődött.

A párhuzamos modell esetében,



a 16. ábrán bemutatott differencia és abszolút spektrumok származtak a köztes formákra.



16. ábra. A köztes állapotok differencia (B) illetve abszolút spektrumai (A) a párhuzamos modell esetében. Az A ábrán feltüntettük a 13 – cisz, illetve all – transz retinált tartalmazó bR spektrumait is. A nyíl jelzi azt a hullámhosszat amin a festéklézer gerjesztett.

Habár az első intermedier differencia spektruma hasonló az *all* – *transz* fotociklus *K* formájának spektrumához, ebben az esetben nem lehet szó a *K* létezéséről, hiszen a kapott időállandó háromszor nagyobb a *K* állapotáénál. A *K* 0.6 μs -os, a 13 – *cisz* fotociklusában megjelenő első forma 1.7 μs -os időállandóval bomlik. Az *all* – *transz* fotociklusban nem alakul ki olyan állapot, melynek az élettideje az itt kapottéhoz közeli lenne.

A párhuzamos modellel számolva azt kaptuk, hogy a teljes 19% gerjesztésből a lézer körülbelül $9 \pm 0.5\%$ -át gerjesztette a 13 – *cisz* fehérjének. Ez a 9% megoszlik a két ág között: 1.5% bomlik a gyors formában, és 7.5% a lassabb lecsengésű állapotban.

Egy 2 μs -os időállandóval rendelkező forma létezésére régebbi mérések is utaltak [51]. A szerzők valószínűnek tartották, hogy ez a gyors átmenet egy *all* – *transz* kromofór kialakulásával lehet kapcsolatos. Az általunk végzett OSMA mérések körülményei között a gyorsan bomló komponens relatív kvantum hatásfoka (az elnyelt kvantum azon része amely megvalósítja a kívánt hatást) 0.05 körül van. Alacsony fényerősségnél a fényadaptáció relatív kvantum hatásfoka 0.035 [39], és ez az érték nő a fényintenzitással [40]. Aránylag magas gerjesztésnél a kvantum hatásfok elérheti a 0.05 -ös értéket, azaz az általunk számolt, gyorsan bomló komponens relatív kvantum hatásfokát. Mindezek valószínűvé teszik, hogy a 13 – *cisz* fotociklus gyors ágában megy végbe a fényadaptáció. Az elágazás a fotociklus korai időpontjában történik. Ez az eredmény összhangban van mások megfigyeléseivel [42], illetve elméleti számolásaival [204], miszerint az elágazás a gerjesztett állapotban játszódik le. Száritott *BR* mintákon végzett mérések azt mutatták, hogy a víz eltávolítása gátolja a 13 – *cisz* fotociklus fő ágát, de a fényadaptálás végbe megy, azaz az elágazás rögtön a gerjesztés után történik [203].

Azonos számolásokat végeztünk a szekvenciális modellre is,



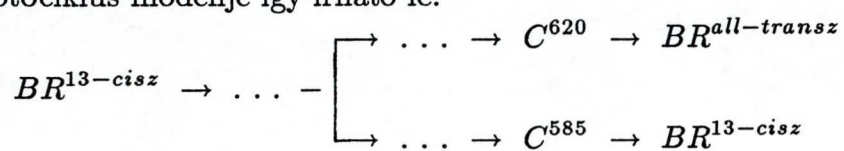
de ebben az esetben ellentmondáshoz jutottunk. Megfelelő köztes állapot spektrumokat (nem ábráztuk őket) $7.5 \pm 0.5\%$ -os gerjesztés feltételezésével kaptunk. Ez 15 – 16% -os összgerjesztést ad, ami pedig jóval alatta marad a korábban kiszámolt 19% körülnek. Amikor 8%-ra emeltük a gerjesztés értékét, elfogadhatatlan intermedier spektrumokat kaptunk. Mindezekből nagyon valószínűnek tűnik, hogy a 13 – *cisz* fotociklust a két párhuzamos reakciósorot tartalmazó modell írja le helyesen.

Az abszorpciókinetikai jelek pH -tól függetleneknek bizonyultak (14. ábra) pH 4 és 7 között. Ez arra utal, hogy a folyamatok nem függenek a protonkoncentrációtól és azoktól a változásoktól sem, amelyek egyes aminosavak titrálódásával kapcsolatosak. Ezért a megfigyelt folyamatok feltehetően mélyen a fehérje belsejében, a retinál közelében játszódnak le.

A 15. ábrán bemutatott fotoelektromos jeleken követhetők a 13 – *cisz* bakteriorodopszinban végbemenő töltésmozgások. Az első gyors negatív jelet egy pozitív követi, amely $1.5 \mu s$ -os időállandóval cseng le. Ez megfelel az optikai jelekben is látott gyors köztes forma bomlásának. A jel amplitúdója kicsi és előjele (lévén pozitív) ellentétes a fényadaptált *bR* -nél megfigyelt *all* – *transz* \rightarrow 13 – *cisz* retinál izomerizációhoz tartozó jelével. Ezért valószínűleg ez a kis pozitív jel tartozik a retinálnak a fényadaptáció során végbemenő 13 – *cisz* \rightarrow *all* – *transz* izomerizációjához. A második negatív komponens időállandója $17 \mu s$ és ennek nincs megfelelője az optikai jelekben. Lehetséges, hogy ez a jel egyes töltött aminosavak oldalláncainak relaxációjával kapcsolatos. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy száraz mintákban, ahol gátoltak a konformációs mozgások, nem jelent meg ilyen komponens az elektromos jelben [205]. Az, hogy optikai megfelelője nincs arra utal, hogy ez a folyamat nem a retinál közvetlen környezetében játszódik le.

Méréseink tehát egyértelműen azt mutatják, hogy a 13 – *cisz* *bR* fotociklusában két köztes forma alakul ki. Azt is kimutattuk, hogy a párhuzamos modell írja le megfelelően ezt a fotociklust és, hogy a fő ágban található a lassabban bomló intermedier. Ezt mások

is megfigyelték kinetikai mérésekből és C^{610} formának nevezték el, mivel a differencia spektrum maximuma 610 nm körül volt [39,51]. Az általunk kiszámolt abszolút spektrumból (16.A ábra) jól látható, hogy a lassú komponens (Int2) abszorpciós maximuma 585 nm körül van. Ez a forma 50 ms alatt visszaalakul a $13\text{-cis } bR$ -be. A gyorsan bomló intermedier (Int1) abszorpciós maximuma 620 nm körül van és valószínűleg az *all-transz* bR -be bomlik $1.7\text{ }\mu\text{s}$ alatt. Feltehetően a fotociklusnak ebben a gyors ágában játszódik le a fényadaptáció. Mivel ez a forma aránylag kis (1.5%) mennyiségben vesz részt a fotociklusban és a 13-cis illetve *all-transz* retinált tartalmazó bR abszorpciói közötti különbség nem túl nagy, sajnos nehéz kimutatni, hogy a 13-cis retinál egy része átalakult *all-transz*-szá egy fotociklus alatt. Eredményeink szerint a 13-cis fotociklus modellje így írható le:

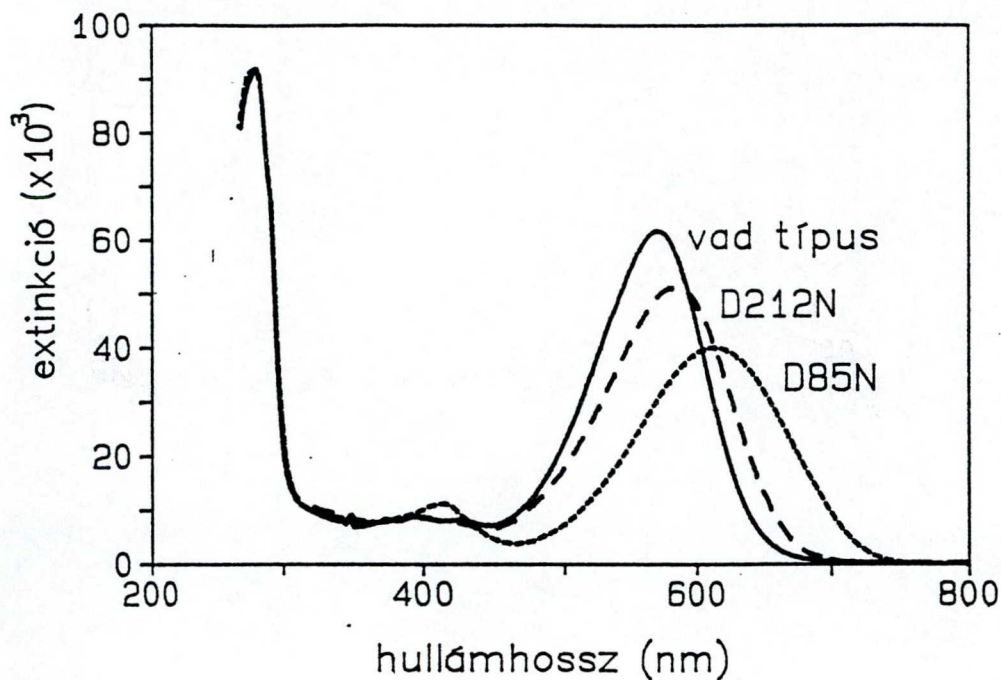


5.2. TÖLTÉSMOZGÁSOK A *D85N* és *D212N* BAKTERIORODOP-SZIN MUTÁNSOKBAN

5.2.1. A *D85N* és *D212N* mutánsok abszorpciókinetikai jelei

Ezekben a mutánsokban a fehérje extracelluláris oldalán levő *Asp*-85 és *Asp*-212 aminosavakat semleges aszparaginra cserélték ki. A mutáció következtében a fotociklus jelentősen egyszerűsödik, és a $BR \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow N \rightarrow BR$ modellel írható le [24,198]. Mivel az *L* és *N* formák spektrumai nehezen választhatók szét, csak két spektrálisan jelentősen különböző köztes állapot van a fotociklusban. Ezért ahhoz, hogy kiszámoljuk ezen formák koncentrációinak időbeli függéseit, elégséges csak két hullámhosszon végeznünk az abszorpciókinetikai méréseket.

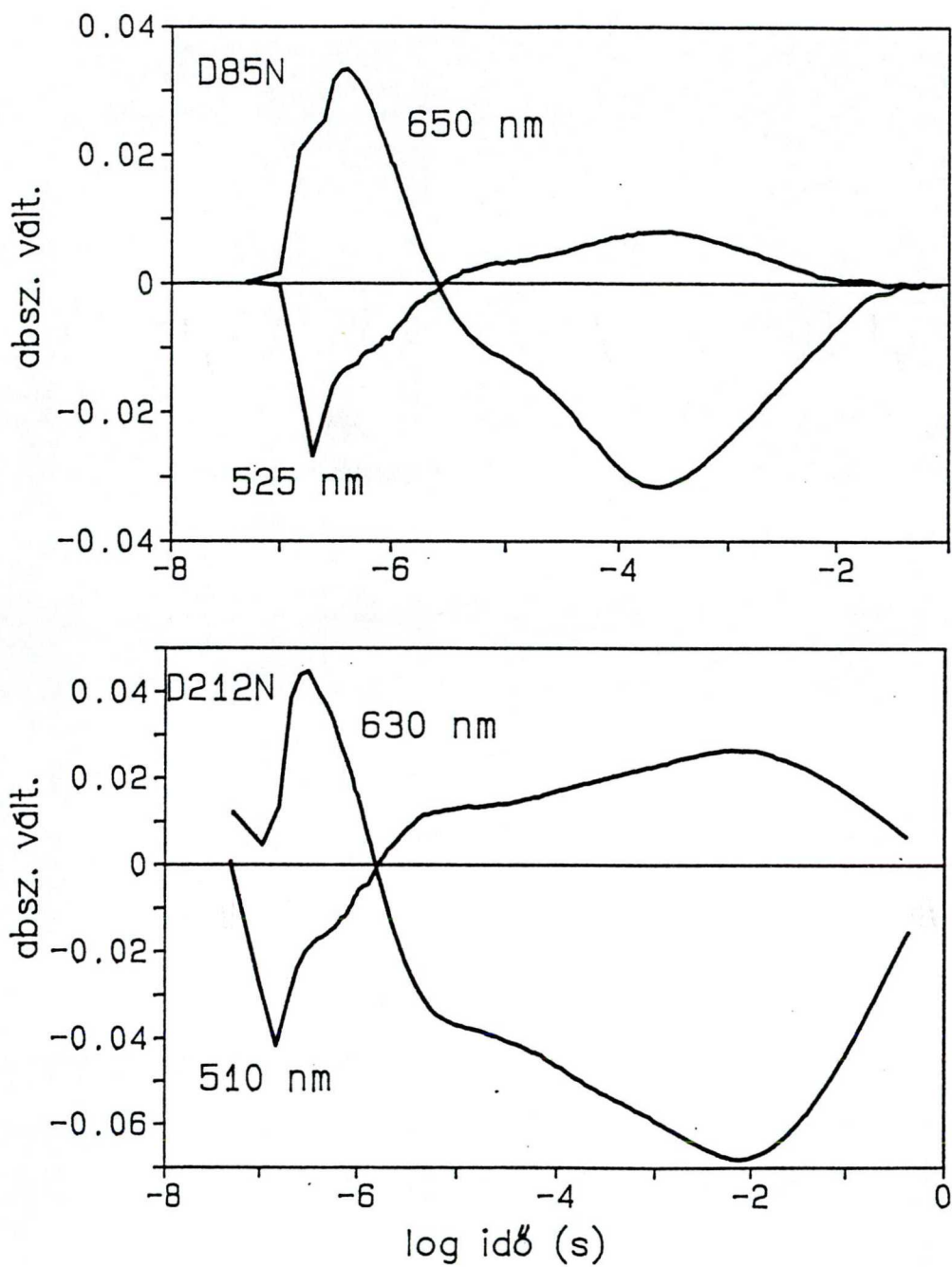
A koncentrációk kiszámolásához szükség van a köztes formák abszolút extinkciós együtthatóira, az irodalomban pedig csak ezek relatív értékeit találjuk meg [24,198]. Ezért meg kellett határoznunk a vad típusú *bR* és a mutánsok spektrumai közötti viszonyt. Ehhez a 280 nm körüli ultraibolya sávra normáltuk a spektrumokat, ugyanis ésszerű feltételeznünk, hogy a kizárólag *bR* -t tartalmazó membrán szuszpenzióban az ennél a hullámhossznál elnyelő aromatikusan gyűrűk száma és ezek környezete nem változik a mutáció során (17. ábra).



17. ábra. A vad típusú bR és a D85N illetve D212N mutánsok abszorpciós spektrumai, miután ezeket a 280 nm -nél levő sávra normáltuk.

A D85N mutáns esetében észrevehető, hogy a fő, 600 nm körüli abszorpciós maximum mellett megjelenik még egy kisebb csúcs 400 nm -nél. Ez megfelel mások megfigyeléseinek, miszerint pH 7 -nél a fehérje lehetséges három populációjából csak kettő van jelen: 5% -nak az abszorpciós maximuma 400 nm körül van, 95% -nak pedig 600 nm körül [195].

A gerjesztés által a mintában előidézett abszorpcióváltásokat a 18. ábrán mutatjuk be.



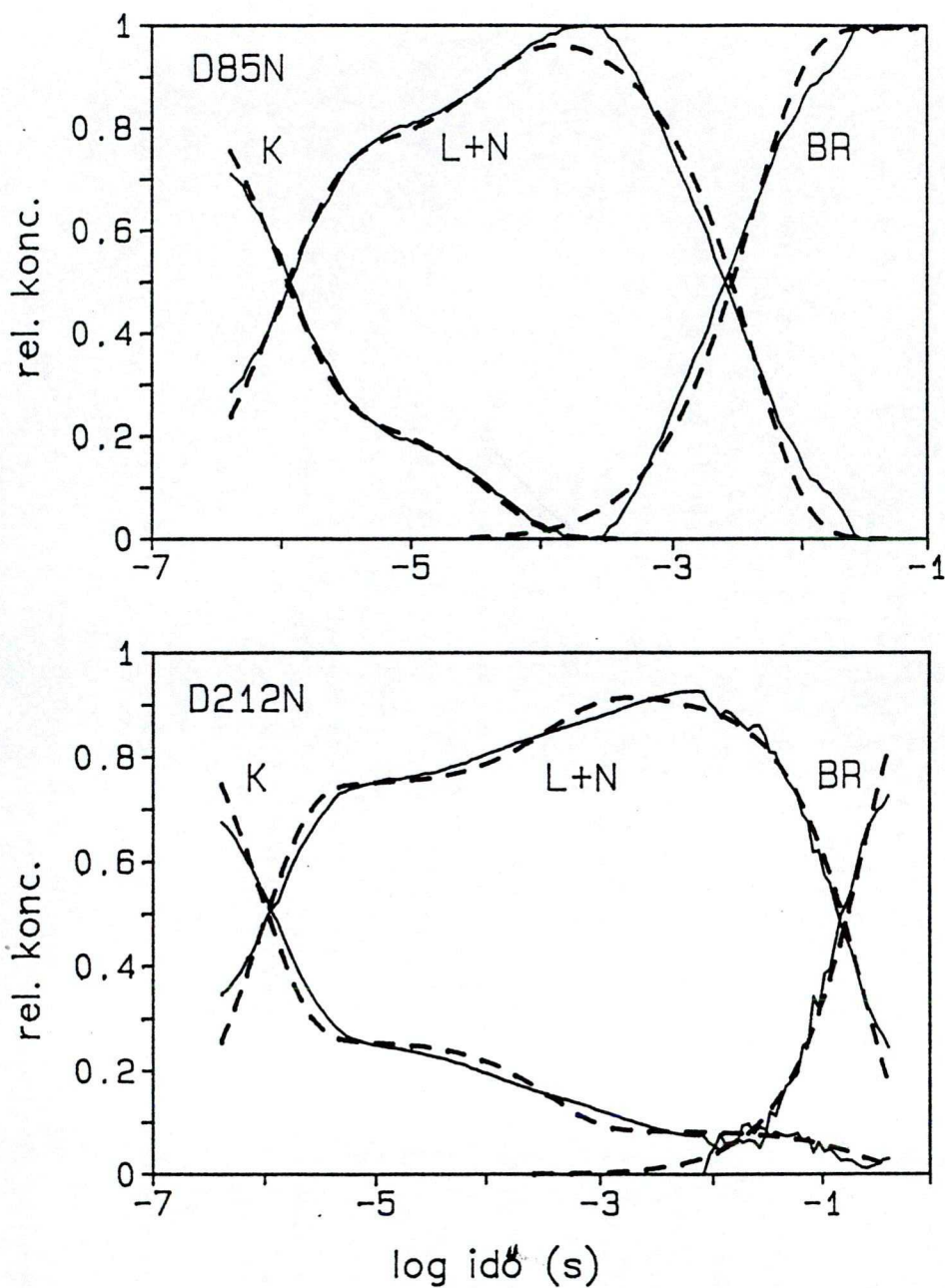
18. ábra. Különböző hullámhosszakon mért abszorpciókinetikai jelek a D85N és D212N mutánsoknál.

A 17. ábra alapján kiszámoltuk a köztes állapotok extinkciós együtthatóit a megfelelő hullámhosszakon, majd az abszorpciós változásokból (18. ábra), ezek koncentrációit is. A számolásokban használt egyenletrendszer, a (9) egyenlet alapján, például a *D85N* mutáns esetében a következő:

$$\begin{aligned}\Delta A_{525}(t) &= \epsilon_{525}^K [K](t) + \epsilon_{525}^{L,N} [L, N](t) - \epsilon_{525}^{BR} [BR](t) \\ \Delta A_{650}(t) &= \epsilon_{650}^K [K](t) + \epsilon_{650}^{L,N} [L, N](t) - \epsilon_{650}^{BR} [BR](t) . \\ [BR](t) &= [K](t) + [L, N](t)\end{aligned}\tag{13}$$

ahol $[L, N]$ az $L + N$ spektrálisan megkülönböztethetetlen formák koncentrációja. Hasonlóan írható fel az egyenletrendszer a *D212N* mutánsra is.

A *D85N* illetve *D212N* mutánsok fotociklusában kialakuló formák koncentrációinak időbeni változását a 19. ábrán mutatjuk be. A koncentrációk időfüggéséhez illesztettük a $BR \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow N \rightarrow BR$ fotociklus modellt (19. ábra, szaggatott vonal). Habár az L és N formák spektrálisan nem különböztethetők meg, az illesztés során kinetikailag jól meghatározhatók. Az átmenetek mikroszkópikus időállandóit az 1. táblázat tartalmazza.



19. ábra. A köztes állapotok koncentrációinak időfüggése a D85N illetve D212N mutánsoknál. Az abszorpcióváltozásokból számolt értékeket a folytonos vonal, a modell illesztés eredményeit a szaggatott vonal jelzi.

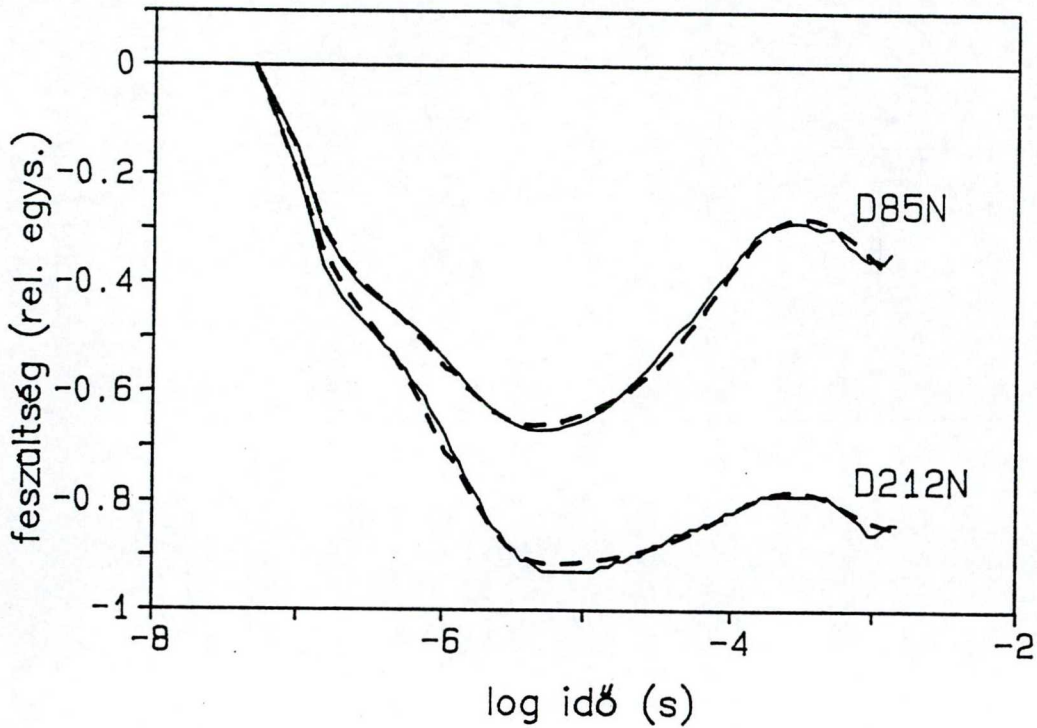
1. táblázat. A szekvenciális modell illesztés alapján kapott időállandók a D85N és D212N mutánsoknál. A hiba $\leq \pm 10\%$.

Átmenet	D85N (s)	D212N (s)
$K \rightarrow L$	1.4×10^{-6}	1.3×10^{-6}
$L \rightarrow K$	4.4×10^{-6}	3.7×10^{-6}
$L \rightarrow N$	3.1×10^{-5}	1.8×10^{-4}
$N \rightarrow L$	∞	3.0×10^{-4}
$N \rightarrow BR$	4.0×10^{-3}	1.7×10^{-1}

5.2.2. A D85N és D212N mutánsok fotoelektromos jelei

Annak ellenére, hogy ezekben a mutánsokban minden bizonnyal nincs protontranszport [165], kis elektromos jelek mérhetők az orientált, gélbe ágyazott mintákon. A mutánsok elektromos jele a vad típusú fehérjéjéhez hasonlóan, tartalmaz egy gyors negatív csúcsot. A mért jeleket erre a csúcsra normálva össze lehet őket hasonlítani. Miliszekundumoknál az áram jele annyira közel van az alapvonalhoz, hogy az ebben az időtartományban lejátszódó folyamatokról nem sokat lehet mondani. Számos információt tartalmaz az áram integrálja, ahol láthatóvá válnak azok a kis jelek, amelyek a jelentős, de lassú töltésmozgások hoznak létre. A mért elektromos jelek idő szerinti integráljai a 20. ábrán láthatók.

Nagyon lassú folyamatoknál, ms -os időtartományban alapvonalcsúszásokat észleltünk, melyek bizonyos kísérleti körülményektől függhetnek (hőmérséklet, az elektrolit vezetőképessége, pH). Ezért az elektromos jelek nem követhetők az egész fotociklus időtartama alatt, de tartalmazzák a kellő információkat az első köztes állapotokról.



20. ábra. A fotoelektromos jel integrálja (folytonos vonal), és modell illesztése (szaggatott vonal) a D85N és D212N mutánsoknál.

Az elektromos jeleket ugyanazzal a szekvenciális modellel illesztettük, amely során kiszámoltuk a fotociklusban kialakuló köztes formák elektrogenitását. Ezeket a 2. táblázatban sorakoztadjuk fel.

A köztes állapotok elektrogenitásaiból a fehérjében lejátszódó töltésmozgásokra tudtunk következtetni.

2. táblázat. A *D85N* és *D212N* mutánsok fotociklusában megjelenő köztes állapotok elektrogenicitásai. A hiba $\leq \pm 15\%$.

Köztes állapot	<i>D85N</i>	<i>D212N</i>
<i>K</i>	-1.0	-1.0
<i>L</i>	-2.0	-4.0
<i>N</i>	-1.1	-2.8

5.2.3. Az eredmények értelmezése: töltésmozgások a *D85N* és *D212N* mutánsokban

A mutánsok fotociklusában megjelenő köztes állapotok koncentrációinak időfüggéséből származtatott kinetikák jó egyezésben vannak előző mérések eredményeivel [24]. Ha a kinetikákat összehasonlítjuk a két mutáns esetében, megfigyelhető, hogy a *D212N* -ben a *K* forma a fotociklus időtartama alatt végig jelen van (19. ábra). Az 1. táblázatban összefoglalt kinetikai állandók pedig azt mutatják, hogy a *D85N* mutánsban gyakorlatilag nincs $N \rightarrow L$ visszareakció. Ugyanakkor a *D212N* -ben az *N* forma lecsengése körülbelül két nagyságrenddel lassabb mint a *D85N* -ben.

A mi mérési körülményeink között nem láttunk protontranszportot ezekben a mutánsokban. Az elektromos jelekből hiányzott a gyors negatív komponenst követő pozitív rész, amely egyébként mindig megjelenik a vad típusú *bR* elektromos jeleiben, protontranszportra utalva [92,193]. Alacsonyabb pH értékeknél, ahol a *D212N* mutánsban megjelenik egy másik spektrális komponens is, figyeltek már meg proton leadást [200].

Ha összehasonlítjuk a két mutánsban megjelenő L formák elektrogenicitásait (2. táblázat) meg lehet állapítani, hogy a $D212N$ esetében ez kétszer akkora mint a $D85N$ -né. Mivel a retinának a $K \rightarrow L$ átmenetben lejátszódó relaxációja [41] feltehetően azonos mindkét mutánsban, a különbség más töltésmozgások létezésére is utal. Ezek lehetnek töltött fehérje oldallánc mozgások, mint ahogy azt már mások is javasolták infravörös mérésekből [206].

Ahhoz, hogy ezekből az adatokból a kicserélt aminosavak protontranszportban vállalt szerepére következtethessünk, a vad típusú bR -re kapott értékekkel kell összehasonlítani őket. A vad típusú fehérje fotociklusában megjelenő K és L formák elektrogenicitásaira vannak régebbi adatok: az L elektrogenicitása kisebb volt [92,193]. Ezekben a számolásokban azonban, az $L \rightarrow K$ illetve $M \rightarrow L$ visszareakciókat nem vették figyelembe. Az új, reverzibilis reakciókat tartalmazó fotociklus modellel számolva a vad típusú bR esetében a $D85N$ mutánsával azonos K , L elektrogenicitásokat kapunk. Későbbi $D96N$ mutánson végzett méréseink is azt eredményezték, hogy az L elektrogenicitása -2 [G4]. Mindezekből úgy tűnik, hogy ez a helyes érték a vad típusú fehérjére is. Következésképpen a $D212N$ mutánsra kapott magas L elektrogenitás az $Asp - 212$ hiányában lejátszódó folyamatoknak tulajdonítható. Úgy tűnik, hogy a vad típusú bR -ben a $K \rightarrow L$ átmenetben az $Asp - 212$ töltött csoportnak stabilizáló hatása van, mozgásával valahogy más oldalláncok mozgását egyensúlyozza ki. Az $Asp - 212$ ezen stabilizáló hatása hozzájárulhat a proton transzport megvalósításához.

Az N forma elektrogenitásai információkat tartalmaznak arról a fehérje konformáció változásról, amely valahol az L és N között játszódik le. Mindkét mutáns esetében az N elektrogenitásai egy egységgel kisebbek az L -nek megfelelőektől. Ez arra utal, hogy valószínűleg mindkét fehérjében az $L \leftrightarrow N$ átmenetben azonos töltések mozgásáról van szó. Az, hogy ezeknek a töltésmozgásoknak megfelelő spektroszkópiai változásokat nem láttuk az optikai mérésekben azt mutatja, hogy a mozgó töltések aránylag messze vannak a retinától.

A vad típusú bakteriorodopszinban az $M \rightarrow N$ átmenet során jelentős mozgást észleltek a fehérje F és G héliceiben [126,207]. A G hélixen van az *Asp* – 212 aminosav. Ha igaz az, hogy a vad típusú és a mutáns *bR* -ben lejátszódó konformációs változások azonosak, megállapíthatjuk, hogy a hélix mozgása nem változtatja meg az *Asp* – 212 töltésének távolságát a membrán felületétől. Eredményeink összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, amely szerint a fehérjében az *L* és *N* között konformációváltozásnak kell végbemennie. Egy ilyen komplex mozgás létezésére már régebbi kinetikai megfontolások is utaltak, mind a vad típusú [106], mind a mutáns *bR* -nél [24].

5.3. TÖLTÉSMOZGÁSOK A *D96N* BAKTERIORODOPSZIN MUTÁNSBAN

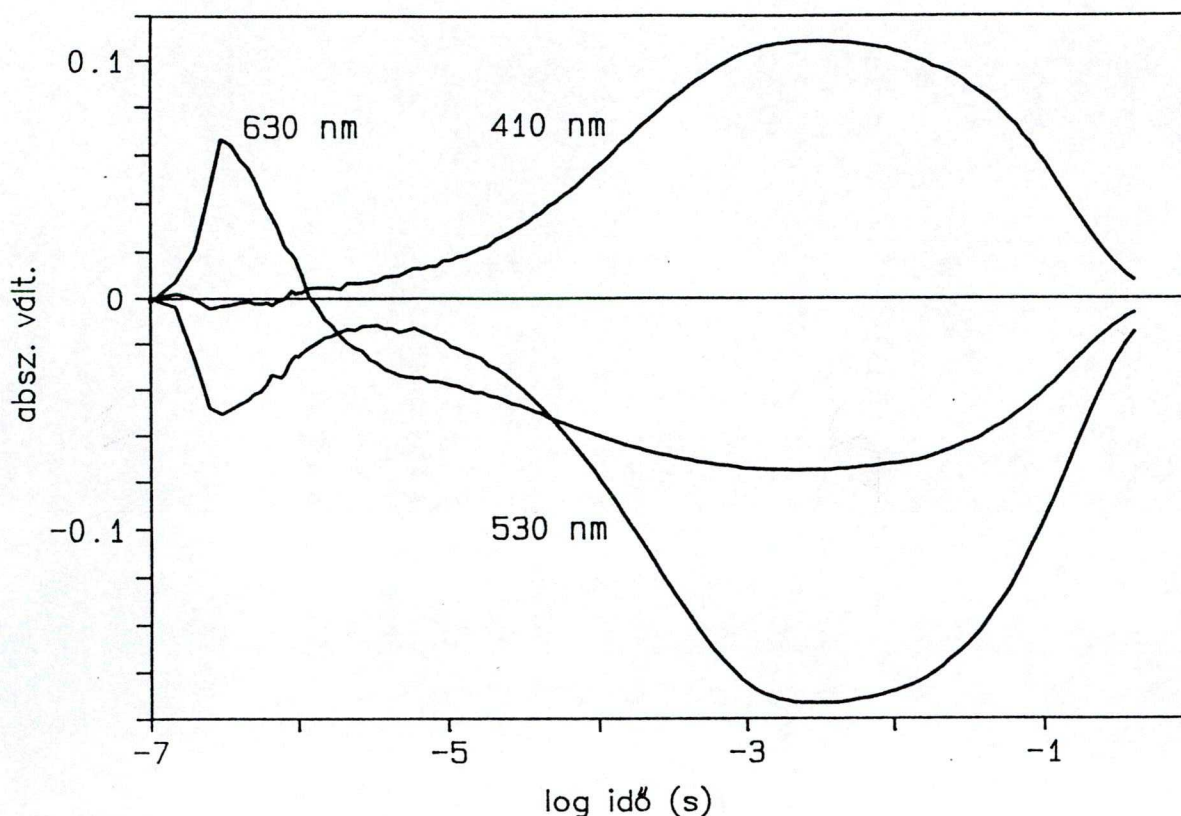
5.3.1. A *D96N* mutáns abszorpciókinetikai jelei

Az *Asp* – 96 fontos szerepet tölt be a protontranszlokáció során, mert ez az aminosav a Schiff-bázis proton donorja. Így főként a fotociklus második felében lejátszódó folyamatok megértésének érdekében, a *D96N* mutánst sokan tanulmányozták [114,134,208,209]. Ezen a fehérjén végeztek már abszorpciókinetikai méréseket és a fotociklusát is modellezték [60,73,115,180]. A töltémozgásokból eredő elektromos jeleket is mérték, de olyan rendszeren amely nem tette lehetővé az abszorpciókinetikai mérések elvégzését azonos körülmények között [114,208]. Ezért a mért elektromos jelek részletes értelmezése, a fotociklus átmeneteihez való hozzárendelése ezidáig ismeretlen volt. Az általunk végzett mérések eredményei ennek és az ezzel kapcsolatos problémák megoldásához vezettek.

Optikai mérési adataink három hullámhosszon felvett abszorpciókinetikai jelekből állnak. A hullámhosszakot úgy választottuk ki, hogy azok mindegyike alapvetően egy köztes állapotot jellemezzék. Az abszorpciókinetikai jelek a 21. ábrán láthatók.

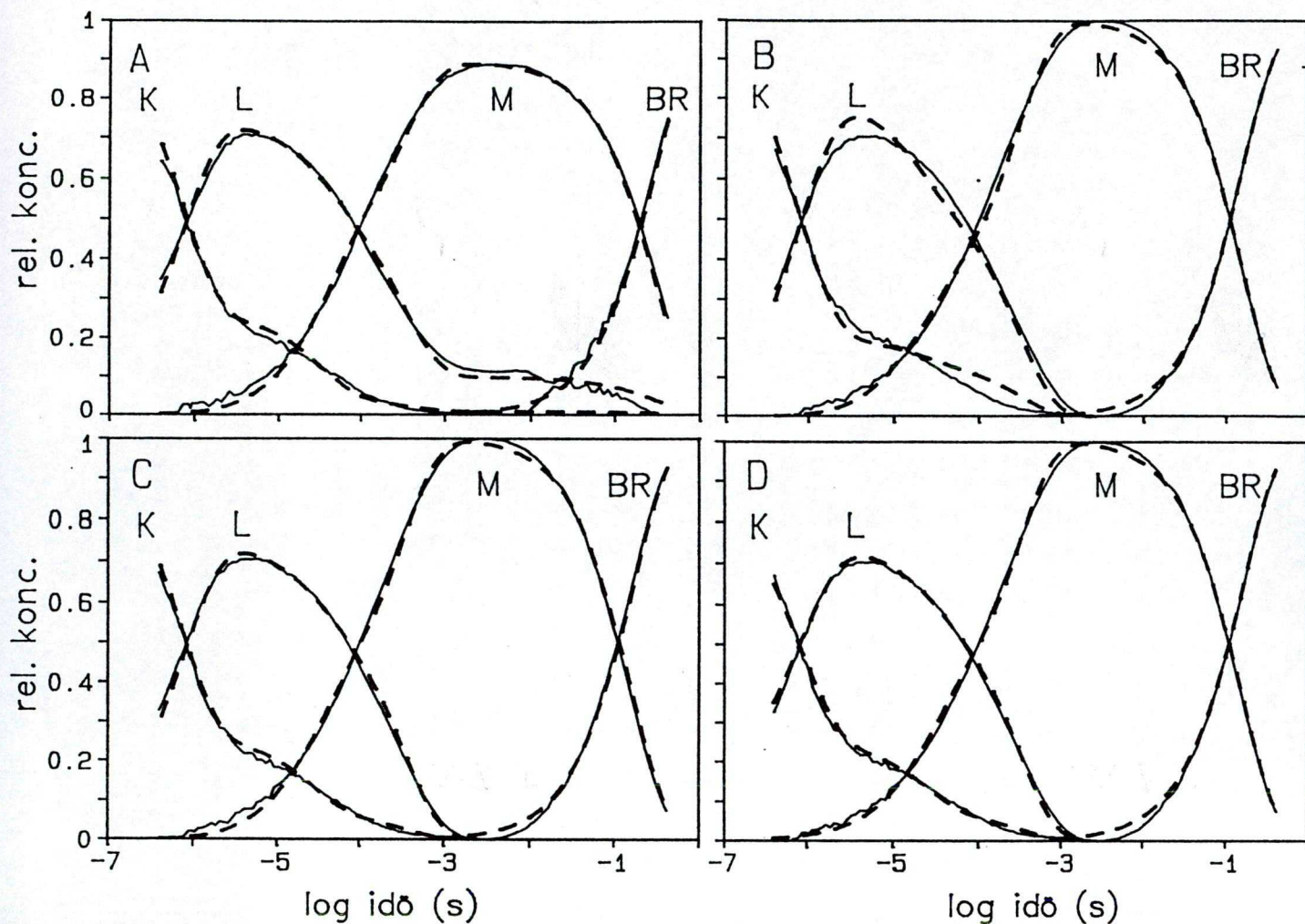
A méréseket pH függvényében is elvégeztük pH 4 és 8 között. Az abszorpcióváltozásokból kiszámoltuk a köztes állapotok koncentrációinak időfüggését, ahogy azt az előbbieken leírtuk az [59] dolgozatból vett extinkciós együtthatókkal. A koncentrációk időfüggéseit a 22. ábrán látható folytonos görbék mutatják.

A következő lépésben különböző fotociklus modelleket illesztettünk a kapott koncentrációkra; az illesztéseket a 22. ábra szaggatott görbéi jelzik. Megfigyelhető, hogy alacsonyabb pH -n az *L* forma az egész fotociklus időtartama alatt jelen van (22.A. ábra). Ez a jelenség nem észlelhető pH 7 -en (22.B,C,D. ábrák), amint azt már korábbi mérések eredményei is jelezték [60].



21. ábra. A D96N mutáns abszorpciókinetikai jelei három különböző hullámhosszon és pH 7 -en.

Ha a modell illesztéseket hasonlítjuk össze, megállapítható, hogy a javasolt $K \leftrightarrow L \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ fotociklus modell illesztése az adatokhoz (22.B. ábra) korábbi illesztésekkel azonos hiányosságokat mutat [60]. A legnagyobb eltérés az adatok és modellezésük között az L forma koncentrációjánál észlelhető. Az illesztések minősége jelentősen javul ha a modellbe bevezetünk még egy L állapotot (I modell): $K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ (22.C. ábra). Egy másik lehetőség lenne az M_1 -ből egy L_2 felé (zsákutra) történő elágazás bevezetése [59], de mivel ennek nem lehetett megfelelő értelmezést adni, az előbbi modell mellett maradtunk.

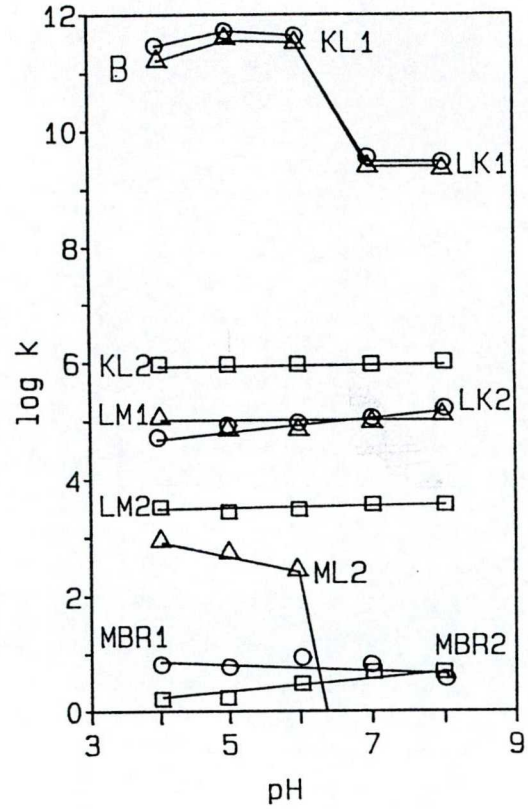
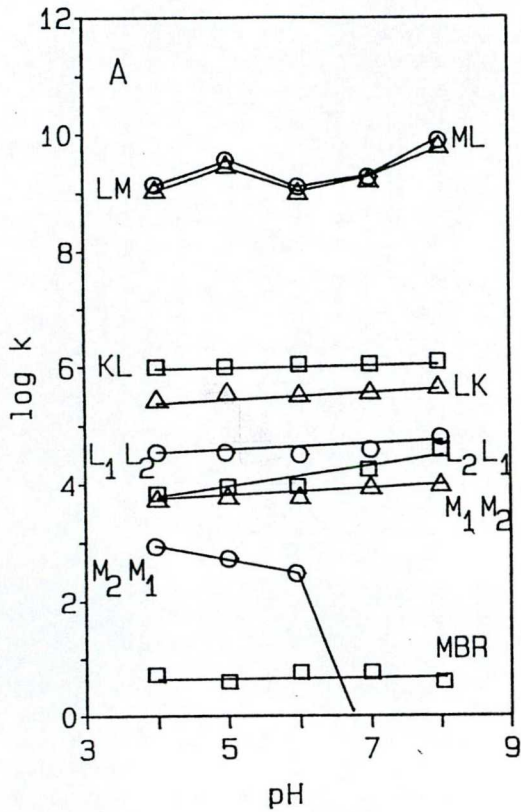


22. ábra. A D96N mutáns fotociklusában megjelenő köztes állapotok koncentrációi; az abszorpció változásokból számolt értékek - folytonos vonal és a modell illesztések - szaggatott vonal: $K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ modell pH 5 (A) és pH 7 (C), $K \leftrightarrow L \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ modell pH 7 (B), $K_1 \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow M_1 \rightarrow BR_1$, $K_2 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR_2$ modell pH 7 (D).

Az egyenirányú reakciókat tartalmazó párhuzamos fotociklus modellel: $K1 \rightarrow L1 \rightarrow M1 \rightarrow BR1$, $K2 \rightarrow L2 \rightarrow M2 \rightarrow BR2$, nem lehet leírni az adatainkat, ez már egyszerű kinetikai megfontolásokból is kitűnt. A K , L és M formák gyors illetve lassú ágon megjelenő koncentrációinak aránya teljesen különbözött és az illesztések is rosszak voltak. Az oda-vissza reakciókat tartalmazó, két párhuzamos ágon futó fotociklus modell (II modell): $K1 \leftrightarrow L1 \leftrightarrow M1 \rightarrow BR1$, $K2 \leftrightarrow L2 \leftrightarrow M2 \rightarrow BR2$ az I modellel azonos illesztést eredményezett (22.D ábra). Az I modell 10, a II modell 11 független illesztési paramétert tartalmaz.

Más, azonos számú, vagy több paraméterrel rendelkező modellt is kipróbáltunk, de az illesztések nem javultak. Ezért a továbbiakban csak az I és II modellekkel foglalkoztunk, mint azon legegyszerűbb modellekkel amelyek jól leírják a mérési adatainkat. Az illesztések és az adatok között megmaradt kis különbségek a mérési hibák mellett feltehetően annak is köszönhetőek, hogy a gerjesztett fehérje termális fluktuációk által okozott, különböző konformációkban van és ez kissé különböző időállandókat eredményez a fotociklusban.

Az illesztésekből kapott kinetikai állandókat pH függvényében ábrázoltuk a 23. ábrán. Az I modell (23.A ábra) előző mérésekkel azonos kinetikai állandókat eredményezett [60]. Az egyetlen különbség a második L formánál észlelhető: az általunk kapott L_1 és L_2 közötti átmenetek megfelelnek a [60] dolgozatban megjelenő L és M közötti oda-vissza reakcióknak. Az I modell az L_2 és M közötti oda-vissza reakciókra egyenlő és rendkívül gyors időállandókat adott, ami arra utal, hogy a két állapot között egy igazi egyensúly alakul ki. Ezeknek a gyors kinetikai állandóknak az értékeit le lehetett csökkenteni két nagyságrenddel anélkül, hogy az illesztések minősége változott volna. Ha az illesztések során az egyik állandó értékét rögzítettük, a másik automatikusan egyenlőnek jött ki vele. Következésképpen megállapíthatjuk, hogy az $L_2 \leftrightarrow M_1$ reakciók sokkal gyorsabbak mint a többiek, de az időállandók pontos értéke bizonytalan és ezért itt a pH függésnek sincs helytálló molekuláris értelmezése.



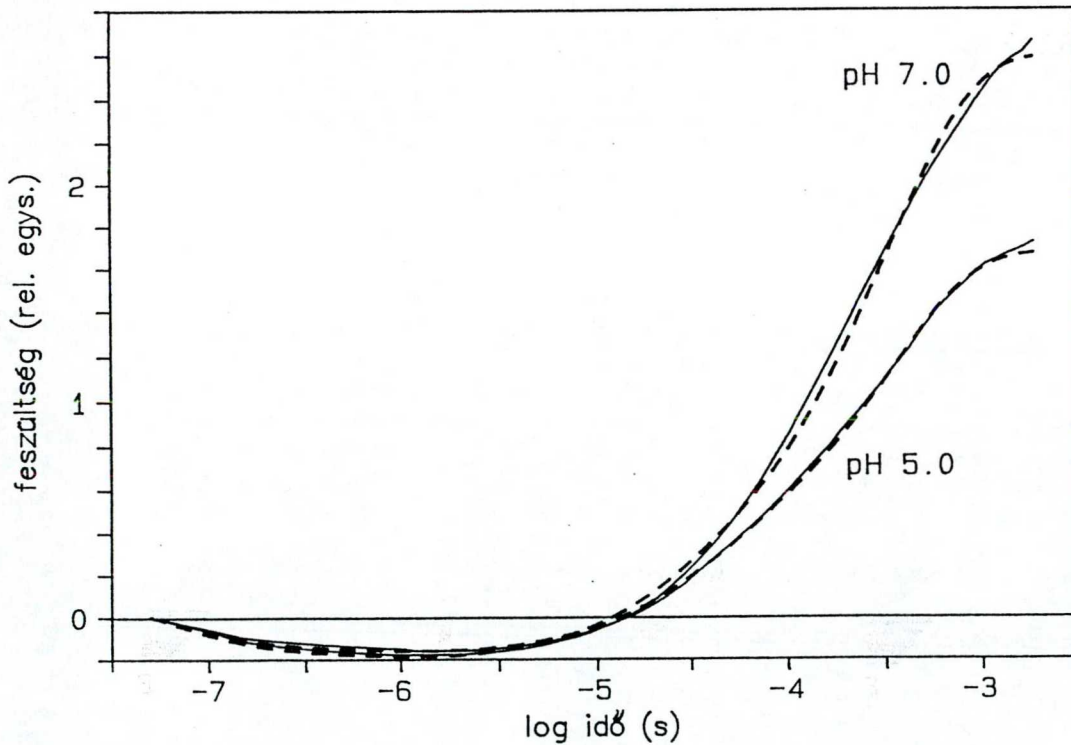
23. ábra. A D96N mutáns fotociklusának sebességi állandói a pH függvényében. Az értékeket a köztes állapotok koncentrációinak illesztéséből kaptuk a: $K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ (A), illetve $K1 \leftrightarrow L1 \leftrightarrow M1 \rightarrow BR1$, $K2 \leftrightarrow L2 \leftrightarrow M2 \rightarrow BR2$ (B) modellekkel. A hiba $< \pm 5\%$, kivéve a leggyorsabb állandókat mindkét modellnél (lásd a szöveget).

A II modellel való illesztésből származó kinetikai állandók hasonló pH függéseket mutatnak, de ebben az esetben az előbbiekkal azonos tulajdonságokkal rendelkező, egyenlő és nagyon gyors sebességi állandókat a fotociklus egyik ágában, a K és L formák között észleltük.

5.3.2. A D96N mutáns fotoelektromos jelei

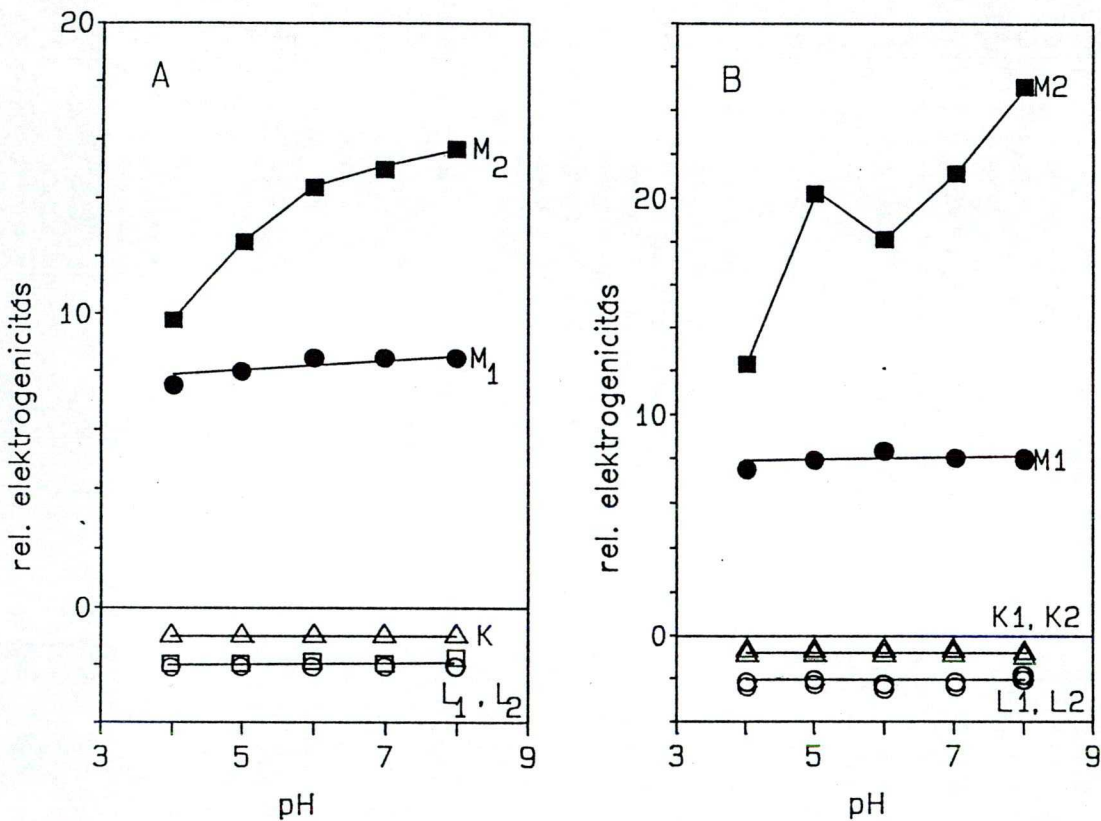
A gerjesztett fehérjében lejátszódó töltésmozgásokról számot adó elektromos jeleket is több pH -n mértük meg: 4 és 8 között. A két modellre kapott időállandókkal illesztettük a fotoelektromos jeleket és kiszámoltuk a fotociklusban megjelenő köztes állapotok elektrogenicitásait. A D96N mutáns fotociklusa esetében is a mért áramjel integrálja több információt tartalmaz, mert itt a lassú, de szignifikáns töltésmozgások által indukált kis jelek is láthatóvá válnak. A 24. ábrán két jellemző integrált elektromos jelet és ezek illesztéseit ábrázoltuk pH 7, illetve pH 5 értékeknél.

Az illesztések a mérési hibahatáron belüliek voltak. A párhuzamos fotociklusokat tartalmazó II modell az I modellel (24. ábra -szaggatott vonal) azonos illesztéseket eredményezett. Az elektromos jelek jelentős pH függést mutattak (24. ábra).



24. ábra. A D96N mutáns fotoelektromos jeleinek integrálja (folytonos vonal) és illesztése a $K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ modellel, pH 5 és 7 -en.

A mi megfigyeléseinkkel ellentétben előző *E. coli*-ban kifejlesztett *D96N* mutánsok elektromos jelei pH függetlenek voltak ebben az időtartományban [208]. Ez a különbség valószínűleg azzal magyarázható, hogy az *E. coli*-ban a *bR* nem alakítja ki a természetes kristályszerkezetét. A számolt elektrogenicitások változását a pH függvényében a 25. ábrán mutatjuk be, mindkét modell esetében. Megfigyelhető, hogy a második *M* forma elektrogenicitása jelentősen függ a pH -tól az I illetve II modellben egyaránt. Ez a függés azonban, csak az I modell esetében volt monoton.



25. ábra. A *D96N* mutáns köztes állapotainak elektrogenitásai a pH függvényében. Az értékeket az elektromos jelek illesztéseiből kaptuk: a $K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ modellel (A), illetve a $K1 \leftrightarrow L1 \leftrightarrow M1 \rightarrow BR1$, $K2 \leftrightarrow L2 \leftrightarrow M2 \rightarrow BR2$ modellel (B). A hiba $< \pm 10\%$.

5.3.3. Az eredmények értelmezése: töltésmozgások a D96N mutánsban

A D96N mutánsban végzett optikai és elektromos méréseink olyan eredményeket szolgáltatottak, amelyekből ennek a fehérjének pH 4 és 8 közötti működésére lehet hasznos következtetéseket levonni. Habár az adatok illesztése a szekvenciális reakciókat tartalmazó I modell esetében azonos volt a párhuzamos fotociklusokat feltételező, II modellre kapottal, a kinetikai állandók és az elektrogenicitások pH függése lehetővé teszi a helyes modell kiválasztását.

Az első jelentős különbség a fotociklus időállandóiban észlelhető: a gyors és egyenlő kinetikai állandókkal rendelkező reverzibilis átmenetek máshol jelennek meg a fotociklusban, modelltől függően. A II modellben ez a két párhuzamosan futó ág egyikében, a K és L formák között jelenik meg (23.B. ábra). A $K \rightarrow L$ átmenet során a retinál és környezete relaxálódik, miután az előtte levő lépésekben a kromofór $all-transz \rightarrow 13-cisz$ izomerizáción esett át [118,210]. Nagyon valószínűtlen, hogy a relaxáció ilyen gyors, ugyanis kis fehérje konformáció változások kísérik és ez lassú folyamat. Egy torzult, feszültségekkel telített rendszerből egy relaxáltat kapunk a $K \rightarrow L$ során, ez pedig magasabb energiaszintről egy alacsonyabbra való átmenetet jelent, a kapott egyensúlyból eredő egyenlő energiaszintekkel ellentétben. Megállapíthatjuk tehát, hogy a $K1 \leftrightarrow L1 \leftrightarrow M1 \rightarrow BR1$, $K2 \leftrightarrow L2 \leftrightarrow M2 \rightarrow BR2$ modellel a $K1 \leftrightarrow L1$ átmenetre valótlán kinetikai állandók származtak. Ugyanakkor a fotociklus másik ágában a $K2 \leftrightarrow L2$ átmenetben az oda és vissza reakciók sebességi állandói között egy nagyságrend a különbség, azaz itt valóban energia veszteséssel járó folyamat megy végbe.

Az adatok szekvenciális, reverzibilis reakciókat tartalmazó (I) modellel való illesztése kinetikai megfontolásokból egy L_2 forma bevezetését tette szükségessé. Egy második L -szerű intermedier létezésére már régebbi mérések is utaltak [51,59,210]. Ha a $K \rightarrow L$ lépésben a retinál és környezete relaxálódik [118,211], akkor nagyon valószínű, hogy ez a relaxáció tovább terjed a fehérjében és új köztes állapot jelenik

meg. Ezek olyan fehérjebeli változások lehetnek amelyek nem hatnak a retinál körüli csoportokra, így az új köztes termék spektruma az előző, L_1 -ével azonos. Ez a folyamat azt is megmagyarázza, hogy a $D85N$ illetve $D212N$ mutánsokban miért nem lehet megkülönböztetni a fotociklusukban kialakuló L és N formák spektrumait [24].

Az illesztések az I modell esetében egyenlő és gyors sebességi állandókat eredményeztek az L_2 és M_1 formák között (23.A. ábra). Ezen átmenet során a proton átkerül a Schiff-bázisról az $Asp-85$ -re [30]. A protonált Schiff-bázis és a proton nélküli $Asp-85$ hidrogén-híd kötésben vannak [212], ami lehetővé teszi, hogy ez az átmenet igen gyorsan lejátsszódjon két egyenlő energiaszint között [213]. Az $L_2 \leftrightarrow M_1$ gyors reverzibilis átmenetre elméleti molekuladinamikai számolások is magyarázatot adnak [214]. Ezek kimutatták, hogy az alapállapotban levő $BR\ all-transz$ retinálja a gerjesztés hatására $13,14-dicisz$ konfigurációba megy át és ezt az állapotát a K és L formákban is fenntartja. Az M -ben azonban, a kromofór már $13-cisz$ formában van. Az elméleti számolások azt bizonyítják, hogy a $13,14-dicisz \rightarrow 13-cisz$ átmenetnek néhány pikoszekundumos életideje van és az átmenet szabadenergia változása nullához közelít, azaz a két állapot között egyensúly alakul ki [214]. Mindezek alapján, tehát a $K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$, II modellel való illesztés során kapott gyors és egyenlő kinetikai állandók valós folyamatokat írnak le az $L_2 \leftrightarrow M_1$ lépésben.

A két modell különböző eredményeket adott a köztes állapotok elektrogenicitásainak pH-tól való függésére is. Az I modell esetében az M_2 elektrogenicitása monoton növekedést mutat a pH függvényében, míg a többi forma elektrogenicitása pH-tól független (25.A. ábra). A sebességi állandók közül csak az $M_2 \rightarrow M_1$ átmenetre kapott érték függ a pH-tól (25.A. ábra). Az elektrogenicitás és a sebességi állandó között nincs egyszerű arányosság, ezért nem függnék feltétlenül azonos pK_a -tól. A sebességi állandó pH függése főként egy, a proton leadásban résztvevő aminosav titrálásával kapcsolatos [60]. Más pK_a -ju, távolabb levő aminosavaknak csak elenyésző hatásuk lehet erre a folyamatra. Az elektrogenicitás azonban, nemcsak a proton leadást, hanem a fehérjében lejátsszódó konformációs változásokat is tükrözi, amelyek során

különböző pK_a -kal rendelkező töltött oldalláncok mozognak. A fotociklus első felében a töltésmozgások pH függetlenek, de azok amelyek az M_1 és M_2 közötti átmenetet kísérik függenek a protonkoncentrációtól: az elektrogenicitás a pH -val nő.

A II modell esetében kapott elektrogenicitások pH függése nem értelmezhető (25.B. ábra). A két párhuzamos ágban megjelenő K és L formák elektrogenicitásai egyenlőek, de a két M -nek megfelelők különböznek. Az egyik M elektrogenicitása pH -tól független, a másik pedig nem monoton pH függést mutat. Az $L \leftrightarrow M$ lépésben a Schiff-bázis átadja protonját az Asp – 85 csoportnak [30], így az elektrogenicitások ezen különös viselkedése nehezen magyarázható ennek a modellnek az alapján. Ha ez az átmenet több molekuláris lépésből tevődik össze, mint például a proton átvitel, konformációs változások, akkor talán elképzelhető egy ilyen komplex pH függés. Ez pedig a II modellt nagy mértékben az I modellhez közelíti, de a két M elektrogenicitásainak oly különböző viselkedése így is nehezen értelmezhető.

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy a fotociklust a szekvenciális, reverzibilis reakciókat tartalmazó modellel lehet helyesen leírni. Ez nem zárja ki párhuzamos fotociklusok megjelenését például a termális fluktuációknak köszönhetően, vagy magasabb pH -kon. A két M forma elektrogenicitása között jelentős különbség van és ezek pH függése sem azonos. Mindezek az eredmények azt támasztják alá, hogy az $M_1 \leftrightarrow M_2$ átmenetben több töltés mozgásával kell számolnunk, mint ahogy az egy fehérje konformáció változásban várható. A két M közötti konformációváltozás valamint a két L forma között lejátszódó relaxáció egyaránt arra utal, hogy a fehérje aktívan és egységes egészként vesz részt a fotociklus folyamataiban.



6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

13 – *cisz* fotociklus:

1. Új módszert dolgoztunk ki a sötétadaptált bakteriorodopszin abszorpciókinetikai és OSMA differencia spektrumainak mérésére és így meg tudtuk határozni a csak 13 – *cisz* retinált tartalmazó fehérjének megfelelő jeleket. Azóta ez a módszer hasznosnak bizonyult az ugyancsak *Halobacterium salinarium*ban található halorodopszin fotociklusának megoldásában is, mert ebben az esetben szintén két izomer formában levő retinált tartalmazó fehérje fotociklusairól van szó [215]. A differencia spektrumok és az abszorpciókinetikai jelek analízise két köztes forma létezését mutatta a mért időintervallumban.

2. Meghatároztuk a 13 – *cisz* fotociklusnak megfelelő elektromos jeleket. Méréseink megerősítették azt a megfigyelést, hogy a mért pH tartományban (pH 4 és 7 között) nincs proton transzport ebben a fotociklusban, *M* forma nem alakul ki. Az elektromos jelben az otikában nem látható új forma is megjelent, valószínűleg a retináltól távolabb lejátszódó töltött aminosav oldalláncok mozgásainak következményeként.

3. A 13 – *cisz* fotociklus (optikában látott) folyamatai pH- függetlenek a mért tartományban (pH 4 és 7 között), ezért ezek feltehetően mélyen a fehérje belsejében játszódnak le. Ez az eredmény ellentétes az *all* – *transz* retinált tartalmazó *bR*-re kapottakkal, ahol jelentős pH függés észlelhető.

4. Meghatároztuk azt a modellt amely leírja a 13 – *cisz* fotociklust: két köztes állapot jelenik meg és ezek párhuzamos ágakban bomlanak le. Az elágazás korán, valószínűleg még a fehérje gerjesztett állapotában történik. A fő ágban található a lassabban bomló intermedier, a gyorsabbik ágban pedig nagy valószínűséggel lejátszódik a fehérje fényadaptációja.

D85N és D212N mutánsok:

5. Megmértük a *D85N* és *D212N* bakteriorodopszin mutánsok abszorpciókinetikai és elektromos jeleit. Protontranszportot mi sem láttunk ezekben a fehérjékben.

6. A $BR \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow N \rightarrow BR$ "csenkített" fotociklus modellt illesztve adatainkra, kiszámoltuk az átmenetek kinetikai állandóit és a töltésmozgásokról számot adó elektrogenicitásokat a fotociklus első formáira. Az eredményeket a vad típusú bakteriorodopszinra kapottakkal hasonlítottuk össze és így az *Asp* – 212 és *Asp* – 85 aminosavak protontranszportban vállalt szerepére tudtunk következtetni.

D96N mutáns:

7. A *D96N* mutáns abszorpciókinetikai jeleiből meghatároztuk a köztes állapotok koncentrációinak időfüggését, majd különböző modellekkel illesztettük az adatokat. Az adatokat a párhuzamos fotociklusokat, illetve a szekvenciális, reverzibilis reakciókat tartalmazó modellek írják le a legjobban. Az utóbbi modellben a kinetikákból egy második *L* forma létezésére következtettünk.

8. A kinetikai állandók mindkét modell esetében egy-egy nagyon gyors egyensúlyi reakciót mutatnak. Ezek közül azonban, csak a szekvenciális modellnél kapott, $L_2 \leftrightarrow M_1$ egyensúlyi átmenetre találtunk valós fizikai magyarázatot. Az időállandók többnyire nem függtek a pH -tól (pH 4 és 8 között), kivéve a két *M* közöttieket.

9. A *D96N* mutáns elektromos jeleit az optikai mérésekkel azonos körülmények között mértük meg, így ezek kvantitatívan is értelmezhetők voltak. Kiszámoltuk a köztes formák elektrogenicitásait.

10. Az elektromos jelek jelentősen függtek a pH -tól. Az elektrogenicitások értékeiben ez a függés csak a második *M* formánál jelentkezett: monoton növekedés a

szekvenciális, nem monoton változás a párhuzamos modellnél.

11. Habár a kinetikákat azonos módon illesztette a két modell, a többi eredmény (8.- 10.) alapján megállapíthatjuk, hogy a fotociklus a $BR \rightarrow K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$ sémával modellezhető helyesen.

12. Lehetséges magyarázatot adtunk az L_2 forma kialakulására, valamint a gyors egyensúlyi, $L_2 \leftrightarrow M_1$ folyamat megjelenésére. Az M_2 elektrogenicitásának kizárólagos pH függése komplex fehérje konformáció változásokra utal a fotociklus ezen pontján.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Váró Györgynek, kutatási éveim alatt nyújtott segítségéért, a hozzáértő és lelkiismeretes vezetéséért. Köszönöm, hogy a bakteriorodopszin-kutatás tárgykörébe bevezetett és, hogy közös munkánk során mindvégig mellettem állt és lépéseimet egyengette. Nagyon sokat tanultam tőle és együttműködésünk mind szakmailag mind emberileg sokat jelent nekem.

Köszönetet szeretnék mondani Keszthelyi Lajosnak, mert ő volt az aki lehetővé tette számomra, hogy az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizika Intézetében dolgozhassak. Első kutatási évemben ő irányította munkámat. Jelenlegi igazgatómnak, Ormos Pálnak tartozom hálával, azért hogy továbbra is a Biofizika Intézet dolgozója lehettem.

Köszönöm azt a segítséget amit Domonkos Mária aszisztens nyújtott a bonyolult biokémiai preparálások sikeres elvégzésében. Szeretném megköszönni Dér Andrásnak, aki közvetlen munkatársam volt a kezdeti időszakban, mindazt amit tőle tanulhattam közös munkánk során. Neki és Zimányi Lászlónak külön köszönöm a dolgozatom részletes átolvasását és a hozzáfűzött építő jellegű megjegyzéseiket.

Köszönettel tartozom a kérdéseimre mindig kézséggel válaszoló Száraz Sándornak és Groma Gézának a mérési adatok kiértékelő (illesztő) programjainak megírásáért is. Hálás vagyok a Magyar Tudományos Akadémiának azért, hogy kutatással foglalkozhatok és, hogy több mint egy évig az általa biztosított fiatal kutatói állás penzkeretén dolgozhattam. Köszönet illeti az MHB "A Magyar Tudományért" Alapítványt azért a támogató segítségért amit a doktori dolgozatom elkészítéséhez nyújtott.

Férjemnek és kisfiamnak hálával tartozom megértésükért, mellyel a munkám jellegéből fakadó életformámat elfogadták és a dolgozat megírásában nyújtott lelki támaszukért.

CHARGE MOTIONS AND PHOTOCYCLE IN WILD TYPE AND MUTANT BACTERIORHODOPSIN

1. Introduction, purposes

The energy transduction in living systems is taking place through the membranes by creating a transmembrane electrochemical potential [1]. Bacteriorhodopsin (*bR*), the protein in the plasma membrane of *Halobacterium salinarium*, turned out to be a protein-pigment complex which performs the transduction of light energy into the movement of protons across the cell membrane by a relatively simple mechanism [2]. The resulting proton gradient is used by the cell to make ATP through ATP-synthetase. Unlike many membrane proteins, *bR* is not free to move in the plane of the membrane. In the isolated membrane patches, called purple membranes, *bR* is arranged in a two dimensional hexagonal lattice in which three molecules can be found at a lattice point [3]. There is an increasing interest in *bR* as example of an ion pump with a potentially solvable structure and function.

Bacteriorhodopsin goes through a cyclic sequential reaction upon light excitation, during which a proton is translocated from the cytoplasmic to the extracellular side. The photocycle consists of several principal intermediate states, labeled *J*, *K*, *L*, *M*, *N*, *O*, that are characterized spectroscopically by different absorption spectra [48]. *bR* was one of the first membrane proteins whose amino acid sequence and three dimensional structure was determined [8,9,10]. The molecule has a seven helix structure arranged to surround the chromophore. The retinal is connected to *Lys* - 216 via a protonated Schiff-base.

There are still a lot of uncertain points in understanding the way, this protein

achieves the proton translocation. Most of the *bR* studies are dealing with those phenomena that are happening after the light excitation. In the absence of light the protein is in its dark-adapted form, in which the retinal is found in two conformations: 13-*cis* and *all-trans* in an isomeric ratio of about 3:2 [37]. Upon prolonged exposure to light the 13-*cis* retinal isomerizes to its *all-trans* form, giving the light-adapted *bR*. Until now there was only a few information about the photocycle of 13-*cis* retinal containing *bR*. We have attempted to complete this missing part by performing optical and electric studies on dark adapted *bR*. The intermediate states of the 13-*cis* protein were resolved and the charge movements during the transitions were determined.

An important problem in *bR* research is the direct detection of the proton translocation process and the related charge motions in the light adapted protein during the photocycle. By measuring the electric signals one can obtain all the information about the global charge motions inside the protein that are perpendicular to the membrane surface. For wild-type *bR* the interpretation of such a complex signal is difficult under normal conditions, due to the large number of intermediates, but it may be easier in different mutants with truncated photocycle. Furthermore, measurements on mutants yield information related to the role of the modified side-chain in the proton pumping process.

2. Materials and methods

Purple membrane suspension was obtained by the standard procedure from *Halobacterium salinarium* strain S9 [5]. The disk-shaped membrane fragments have a permanent electric dipole moment, they can be oriented by a relatively weak stationary electric field. The sample containing oriented purple membranes is excited by a laser flash. The light absorption changes and the displacement current caused by charge motions inside the protein (PERS) are measured.

An appropriate method to study the process of light- and dark adaptation is

the measurement of electric signals, because this type of experiment does not need monitoring light. Nevertheless for their further interpretation we need to know the absorption changes. To determine the spectra of the intermediate states of the protein we measured with an optical spectroscopic multichannel analyzer (OSMA) the difference spectra too. In order to do these experiments we used a home-made stopped flow cuvette synchronized to the laser which changed the suspension in the cuvette after every excitation. From the dark-adapted *bR* signals the light-adapted ones (multiplied by a factor) were subtracted. The multiplication factor was determined in such a way that the resulting signal around 410 nm, corresponding to the *M* intermediate disappeared, as in the measured pH range there is no *M* form corresponding to the 13 - *cis* photocycle [47]. After the subtraction the remaining part is that belonging to the 13 - *cis* retinal containing *bR*. Singular value decomposition of the difference spectra and global fitting of the optical kinetic and electric signals were performed.

The purple membrane fragments of *D85N*, *D212N* and *D96N* mutants expressed in *Halobacterium salinarium* were supplied by J.K. Lanyi (Irvine, California). The degree of orientation of these membrane fragments in a DC electric field was compared to that of wild-type *bR* and they were similar [192]. The oriented purple membranes were immobilized in polyacrylamide gel [194]. The samples were kept in a solution containing salt and phosphate buffer. Absorption kinetic data at different wavelengths together with the corresponding electric signal were recorded after laser excitation of the sample. From the measured absorption changes the time dependent concentration changes of the photocycle intermediates were calculated. The results were fitted with different models obtaining the rate constants of the transitions. The kinetic parameters were used to fit the measured electric signals and calculate the electrogenicity corresponding to every intermediate. The electrogenicity is the relative dipole magnitude of an intermediate compared to the initial state [82]. The measured displacement current signal was fitted together with its integral; the later one reveals more information about the very small currents induced by slow but significant charge motions.

3. Results and conclusions

The photocycle of 13 – cis retinal containing bR

The OSMA difference spectra of the dark- and light- adapted *bR* show complex changes within the measured time period. To subtract the light-adapted spectra in such a way that the peak corresponding to the *M* intermediate around 410 nm disappears, they had to be normalized with a factor of 0.52, giving a 13 – *cis/all – trans* isomeric ratio in the dark adapted form of about 1:1. This ratio is very dependent on temperature, pH, ionic strength, but is in good agreement with earlier publications [37,41]. The SVD analysis of the difference spectra belonging to the 13 – *cis* photocycle showed two dominant component spectra. It turned out from the exponential fitting that the two intermediates are decaying with time constants 1.9 μ s and 46 ms respectively.

The absorption kinetic measurements revealed the same two lifetimes and no kinetic changes were found when the pH was varied between 4 and 7, pointing out that in this pH interval the processes belonging to the 13 – *cis* photocycle are pH-independent.

The same subtraction was performed to determine the electric signal corresponding to the 13 – *cis* photocycle from the ones measured on dark- and light- adapted *bR*. The exponential fitting revealed the existence of two processes with lifetimes of about 1.5 μ s and 17.5 μ s. The later one has no correspondent in the optical signals. Following the first fast negativ signal a small positive component (1.5 μ s lifetime) is appearing, which is opposite to the *all – trans* \rightarrow 13 – *cis* isomerization signal observed in the light-adapted *bR*.

Two models were considered: a parallel model that could originate from a very early branching, and a sequential one. Reconstruction of the model-dependent difference and absolute spectra of the intermediates revealed that the suitable model to

describe the 13 - *cis* photocycle is the parallel one. The calculations suggest that the fast branch of the 13 - *cis* photocycle is related to the light adaptation process of the *bR*. The branching occurs in the early part of the photocycle, probably in the excited state of the molecule. This explains the observed positive component of the electric signal, attributed to the 13 - *cis* → *all-trans* isomerization of the retinal.

D85N and D212N bR mutants

We have measured the absorption kinetic and electric signals of these *bR* mutants. In accordance with earlier reports there is no proton transport in our measuring conditions in the *D85N* and *D212N* mutants.

The absorption changes were converted to concentration changes of the intermediates. The time course of the concentrations was fitted with the model $BR \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow N \rightarrow BR$ for both mutants. The obtained kinetic parameters of the transitions were used to fit the electric signals and determine the electrogenicities of the intermediates. Comparing the data obtained for the mutants with those of wild type *bR*, conclusions have been drawn on the role of the changed amino-acids in the proton transport.

D96N bR mutant

From the measured absorption changes the time dependent concentrations of the intermediates were calculated. Different photocycle models were fit to the time course of the concentrations. Two simple models were found to fit the data equally well; the unidirectional two parallel photocycles model: $K_1 \rightarrow L_1 \rightarrow M_1 \rightarrow BR_1$, $K_2 \rightarrow L_2 \rightarrow M_2 \rightarrow BR_2$ and the sequential one with reversible reactions: $K \leftrightarrow L_1 \leftrightarrow L_2 \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \rightarrow BR$. The L_2 form was introduced on kinetic basis to improve the fit at the L intermediate and later justified by finding a physical meaning for it.

The kinetic parameters of the two models were pH independent (between pH 4 and 8), but the transitions including the M form. The fits revealed for both models the

existence of a reversible reaction with high and equal rate constants at different steps in the photocycle. Reasonable explanation can be given only for the one appearing in the $L_2 \leftrightarrow M_1$ transition of the sequential model.

The electric signal of the *D96N* mutant was measured in the same conditions as the optical changes, so the values of the electrogenicities corresponding to every intermediate could be calculated. The electric signal showed strong pH dependence. In both models this appeared as the pH dependence of the electrogenicity for the second *M* form. However the dependence is monotonic only for the sequential model.

Although the kinetic fits were equally good for both models on the basis of the differences that appear in the pH dependence of the electrogenicities and in the position of a fast equilibrium we concluded that the proper photocycle is the sequential one. The L_2 form appears as a consequence of the relaxation of the retinal, taking place in the *K* to *L* reaction, which propagates further in the protein. The pH dependence of M_2 suggests complex conformation changes in the M_1 to M_2 transition.

8. IRODALOM

- [1] Mitchell, P. (1961) *Nature* 191:144-148.
- [2] Oesterhelt, D. és W. Stoeckenius (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2853-2857.
- [3] Henderson, R. J. (1975) *J. Mol. Biol.* 94:123-138.
- [4] Blaurock, A. E. és W. Stoeckenius (1971) *Nature* 233:152-155.
- [5] Oesterhelt, D. és W. Stoeckenius (1974) *Meth. Enzimol.* XXXI:667-678.
- [6] Jonas, R., Y. Koutalos és T. G. Ebrey (1990) *Photochem. Photobiol.* 52:1163-1177.
- [7] Szundi, I. és W. Stoeckenius (1989) *Biophys. J.* 56:369-383.
- [8] Ovchinnikov, Y. A., N. G. Abdulaev, M. Y. Feigina, M. Y. Kiselev és N. A. Lobanov (1979) *FEBS Lett* 100:219-224.
- [9] Engelman, D. M., R. Henderson, A. D. McLaghlan és B. A. Wallace (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2023-2027.
- [10] Henderson, R. és P. N. T. Unwin (1975) *Nature* 257:28-32.
- [11] Henderson, R., J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann és K. H. Downing (1990) *J. Mol. Biol.* 213:899-929.
- [12] Stoeckenius, W., P. K. Wolber és N. V. Katre (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4068-4072.
- [13] Lewis, A., I. Spoonhower, R. A. Bogomolni, R. H. Lozier és W. Stoeckenius (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:4462-4466.

- [14] Bogomolni, R. A., S. B. Hwang, Y. W. Tseng, G. I. King és W. Stoeckenius (1977) *Biophys. J.* 17: 98a.
- [15] Barabás, K. A., A. Dér, Zs. Dancsházy, P. Ormos, L. Keszthelyi és M. Marden (1983) *Biophys. J.* 43:5-11.
- [16] Earnest, T. N., P. Rolpe, M. S. Braiman, J. Gillespie, K. J. Rotschild (1986) *Biochemistry* 25:7793-7798.
- [17] Heyn, M. P., J. Westerhausen, I. Wallat és F. Seiff (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2146-2150.
- [18] Hauss, T., S. Grezesiek, H. Otto, J. Westerhausen és M. P. Heyn (1990) *Biochemistry* 29:4904-4913.
- [19] Harbison, G. S., J. Herzfeld és R. G. Griffin (1983) *Biochemistry* 22:1-5.
- [20] Spudich, J. L., D. A. McCain, K. Nakanishi, M. Okabe, N. Shimizu, H. Rodman, B. Honig és R. A. Bogomolni (1986) *Biophys. J.* 49:479-483.
- [21] Ottolenghi, M. és M. Sheves (1989) *J. Membr. Biol.* 112:193-212.
- [22] Subramaniam, S., T. Marti és H. G. Khorana (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1013-1017.
- [23] Marti, T., S. J. Rösselet, H. Otto, M. P. Heyn és H. G. Khorana (1991) *J. Biol. Chem.* 266:18674-18683.
- [24] Needleman, R., M. Chang, B. Ni, G. Váró, J. Fornés, S. H. White és J. K. Lanyi (1991) *J. Biol. Chem.* 266:11478-11484.
- [25] De Groot, H. J., G. S. Harbison, J. Herzfeld és R. G. Griffin (1989) *Biochemistry*

28:3346-3353.

- [26] Hildebrandt, P. és M. Stockburger (1984) *Biochemistry* 23:5539-5548.
- [27] Dér, A., S. Száraz, R. Tóth-Boconádi, Z. Tokaji, L. Keszthelyi és W. Stoeckenius (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4751-4755.
- [28] Van der Steen, R., P. L. Biesheuvel, P. A. Mathies és J. Lugtenburg (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108:6410-6411.
- [29] Harbison, G. S., S. O. Smith, J. A. Pardoen, J. M. L. Courtin, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. A. Mathies és R. G. Griffin (1985) *Biochemistry* 24:6955-6962.
- [30] Braiman, M. S., T. Mogi, T. Marti, L. J. Stern, H. G. Khorana és K. J. Rotschild (1988) *Biochemistry* 27:8516-8520.
- [31] Rotschild, K. J., M. S. Braiman, T. Mogi, L. J. Stern és H. G. Khorana (1989) *FEBS Lett* 250:448-452.
- [32] Rotschild, K. J., Y. W. He, T. Mogi, T. Marti, L. J. Stern és H. G. Khorana (1990) *Biochemistry* 29:5954-5960.
- [33] Mogi, T., T. Marti és H. G. Khorana (1989) *J. Biol. Chem.* 264:14197-14201.
- [34] Doukas, A. G., A. Paude, T. Suzuki, R. H. Callender, B. Honig és M. Ottolenghi (1981) *Biophys. J.* 33:275-280.
- [35] Oesterhelt, D., M. Meentzen és L. Schulmann (1973) *Eur. J. Biochem* 40:453-463.
- [36] Scherrer, P., W. Stoeckenius, M. K. Mathew és W. Sperling (1987) *Biophysical Studies of Retinal Protein; kiadók T. G. Ebrey, H. Frauenfelder, B. Honig és K. Nakanishi*: 206-211.

- [37] Harbison, G. S., S. O. Smith, J. A. Pardo, C. Winkel, J. Lugtenburg, R. A. Mathies és R. G. Griffin (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1706-1709.
- [38] Steinberg, G., Friedmann, M. Sheeves és M. Ottolenghi (1991) *Photochem. Photobiol.* 54:969-976.
- [39] Kalisky, O., C. R. Goldschmidt és M. Ottolenghi (1977) *Biophys. J* 19:185-189.
- [40] Bryl, K., M. Taiji, M. Yoshizawa és T. Kobayashi (1992) *Photochem. Photobiol.* 56:1013-1018.
- [41] Stoerkenius, W., R. H. Lozier és R. A. Bogomolni (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 505:215-278.
- [42] Váró, G. és K. Bryl (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 934:247-252.
- [43] Brown, L. S. és S. K. Chamorovsky (1993) *J. Photochem. Photobiol.* 18:123-126.
- [44] Balashov, S. P., R. Govindjee, M. Kono, E. S. Imasheva, E. P. Lukashev, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, D. R. Menick és J. Feng (1993) *Biochemistry* 32:10331-10343.
- [45] Lozier, R., W. Niederberger, R. Bogomolni, S. B. Hwang és W. Stoerkenius (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440:545-556.
- [46] Drachev, L. A., A. D. Kaulen, V. P. Skulachev és V. V. Zorina (1988) *FEBS Lett.* 239:1-4.
- [47] Drachev, L. A., S. V. Dracheva és A. D. Kaulen (1993) *FEBS Lett* 332: 67-70.
- [48] Lozier, R. H., R. A. Bogomolni és W. Stoerkenius (1975) *Biophys. J.* 15:955-962.
- [49] Kung, M. C., D. Devault, B. Hess és D. Oesterhelt (1975) *Biophys. J.* 15:907-911.

- [50] Xie, A. H., J. F. Nagle és R. H. Lozier (1987) *Biophys. J.* 51: 627-635.
- [51] Hofrichter, J., E. R. Henry és R. H. Lozier (1989) *Biophys. J.* 56:693-706.
- [52] Maurer, R., J. Vogel és S. Schneider (1987) *Photochem. Photobiol.* 46:255-262.
- [53] Zimányi, L., L. Keszthelyi és J. K. Lanyi (1989) *Biochemistry* 28:5165-5172.
- [54] Váró, G. és J. K. Lanyi (1989) *Biochemistry* 28:5165-5022.
- [55] Gerwert, K., G. Souvignier és B. Hess (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9774-9778.
- [56] Müller, K. H., H. J. Butt, E. Bamberg, K. Fendler, B. Hess, F. Siebert és M. Engelhard (1991) *Eur. Biophys. J.* 19:241-251.
- [57] Váró, G. és J. K. Lanyi (1991) *Biochemistry* 30:5016-5022.
- [58] Nagle, J. F. (1991) *Biophys. J.* 59:476-487.
- [59] Zimányi, L. és J. K. Lanyi (1993) *Biophys. J.* 64:240-251.
- [60] Zimányi, L., G. Váró, M. Chang, B. Ni, R. Needleman és J. K. Lanyi (1992) *Biochemistry* 31:8535-8543.
- [61] Brown, L. S., Y. Gat, M. Sheves, Y. Yamazaki, A. Maeda, R. Needleman és J. K. Lanyi (1994) *Biochemistry* 33:12001-12011.
- [62] Lozier, R. H., A. Xie, J. Hofrichter és G. M. Clore (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3610-3614.
- [63] Nagle, J. F., L. Zimányi és J. K. Lanyi (1995) *Biophys. J.* 68:1490-1499.

- [64] Parodi, L. A., R. H. Lozier, S. M. Bhattacharjee és J. F. Nagle (1984) *Photochem. Photobiol.* 40:501-506.
- [65] Nagle, J. F., L. A. Parodi és R. H. Lozier (1982) *Biophys. J.* 38:161-174.
- [66] Hanamoto, J., P. Dupnis és M. El Sayed (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7083-7087.
- [67] Dancsházy, Zs., R. Govindjee és T. G. Ebrey (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6358-6361.
- [68] Diller, R. és M. Stockburger (1988) *Biochemistry* 27:7641-7651.
- [69] Drachev, L. A., A. D. Kaulen és A. Y. Komrakov (1992) *FEBS Lett.* 313:248-250.
- [70] Beach, J. M. és R. S. Fager (1985) *Photochem. Photobiol.* 41:557-562.
- [71] Ames, J. B. és R. A. Mathies (1990) *Biochemistry* 29:7181-7190.
- [72] Váró, G., A. Duschl és J. K. Lanyi (1990) *Biochemistry* 29:3798-3804.
- [73] Váró, G. és J. K. Lanyi (1991) *Biochemistry* 30:5008-5015.
- [74] Fukuda, K. és T. Kouyama (1992) *Biochemistry* 31:11740-11747.
- [75] Souvignier, G. és K. Gerwert (1992) *Biophys. J.* 63:1393-1405.
- [76] Milder, S. J., T. E. Thorgeirsson, L. J. W. Miercke, R. M. Stroud és D. S. Kliger (1991) *Biochemistry* 30:1751-1761.
- [77] Sharkov, A. V., A. V. Pakulev, S. V. Chekalin és Y. A. Matveetz (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 808:94.

- [78] Polland, H. J., M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling és D. Oesterhelt (1986) *Biophys. J.* 49:651-662.
- [79] Mathies, R. A., C. H. B. Cruz, W. T. Pollard és C. V. Shank (1988) *Science* 240:777-779.
- [80] Van den Berg, R., D. J. Jang, H. C. Bitting és M. A. El Sayed (1990) *Biophys. J.* 58:135-141.
- [81] Doig, S. J., P. J. Reid és R. A. Mathies (1991) *J. Phys. Chem.* 95:6372.
- [82] Trissl, H. W. (1990) *Photochem. Photobiol.* 51:793-818.
- [83] Balashov, S. P., E. S. Imasheva, R. G. Govindjee és T. G. Ebrey (1991) *Photochem. Photobiol.* 54:955-961.
- [84] Goldschmidt, C. R., O. Kalisky, T. Rosenfeld és M. Ottolenghi (1977) *Biophys. J.* 17:179-183.
- [85] Honig, B., T. Ebrey, R. Callender, U. Dinur és M. Ottolenghi (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2503-2507.
- [86] Brack, T. L. és G. H. Atkinson (1989) *J. Molec. Srtucture* 214:289-303.
- [87] Kuschmitz, D. és B. Hess (1982) *FEBS Lett.* 138:137-140.
- [88] Becher, B., F. Tokunaga és T. G. Ebrey (1978) *Biochemistry* 17:2293-2300.
- [89] Braiman, M. S. és R. Mathies (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:403-407.
- [90] Eisenstein, L., S. L. Lin, G. Dollinger, K. Odashima, J. Termini, K. Konno, W. D. Ding és K. Nakanishi (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109:6860-6862.

- [91] Drachev, L. A., A. D. Kaulen és V. P. Skulachev (1978) *FEBS Lett* 87:161-167.
- [92] Keszthelyi, L. és P. Ormos (1980) *FEBS Lett* 109:189-193.
- [93] Birge, R. R. (1990) *Annu Rev. Phys. Chem.* 41:683.
- [94] Liu, S. Y. és T. G. Ebrey (1988) *Biophys. J.* 54:321-329.
- [95] Ormos, P., K. Chu és J. Mourant (1992) *Biochemistry* 31:6933-6937.
- [96] Gerwert, K., B. Hess, J. Soppa és D. Oesterhelt (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4943-4947.
- [97] Maeda, A., J. Sasaki, Y. Shichida, T. Yoshizawa, M. Chang, B. Ni, R. Needleman és J. K. Lanyi (1992) *Biochemistry* 31:4684-4690.
- [98] Braiman, M. S., O. Bousché és K. J. Rotschild (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2388-2392.
- [99] Sasaki, J., A. Maeda, C. Kato és H. Hamaguchi (1993) *Biochemistry* 32:867-871.
- [100] Váró, G. és J. K. Lanyi (1991) *Biophys. J* 59:313-322.
- [101] Tsuda, M., Glaccum, B. Nelson és T. Ebrey (1980) *Nature* 287:351-353.
- [102] Smith, S. O., I. Hornung, R. van der Steen, J. A. Pardo, H. S. Braiman, J. Lugtenburg és R. A. Mathies (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:967-971.
- [103] Fodor, S. P. A., W. T. Pollard, R. Gebhard, E. van den Berg, J. Lugtenburg és R. A. Mathies (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2156-2160.
- [104] Bitting, H. C., D.-J. Jang és M. A. El-Sayed (1990) *Photochem. Photobiol.* 51:593-

- [105] Balashov, S. P., R. Govindjee és T. G. Ebrey (1991) *Biophys. J.* 60:475-490.
- [106] Váró, G. és J. K. Lanyi (1990) *Biochemistry* 29:2241-2250.
- [107] Zimányi, L., Y. Cao, M. Chang, B. Ni, R. Needleman és J. K. Lanyi (1992) *Photochem. Photobiol.* 56:1049-1055.
- [108] Liu, S. Y. (1990) *Biophys. J.* 57:943-950.
- [109] Lin, G. C., E. S. Awad és M. A. El-Sayed (1991) *J. Phys. Chem.* 95:10442.
- [110] Váró, G., L. Zimányi, M. Chang, B. Ni, R. Needleman és J. K. Lanyi (1992) *Biophys. J.* 61:820-826.
- [111] Beece, D., S. Browne, J. Czégé, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, D. Good, M. Marden, P. Ormos és L. Reinisch (1981) *Photochem. Photobiol.* 33:517-522.
- [112] Honig, B. (1978) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 29:31-57.
- [113] Siebert, F., W. Mantele és W. Kreutz (1982) *FEBS Lett* 141:82-87.
- [114] Butt, H. J., K. Fendler, E. Bamberg, J. Tittor és D. Oesterhelt (1989) *EMBO J.* 8:1657-1663.
- [115] Metz, G., F. Siebert és M. Engelhard (1992) *FEBS Lett* 303:237-241.
- [116] Fahmy, K., O. Weidlich, M. Engelhard, H. Sigrist és F. Siebert (1993) *Biochemistry* 32:5862-5869.
- [117] Heberle, J. és N. A. Dencher (1990) *FEBS Lett.* 277:277-280.

- [118] Mathies, R. A., S. W. Lin, J. B. Ames és W. T. Pollard (1991) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:491-518.
- [119] Scharnagl, C., J. Hettenkofer és S. F. Fischer (1995) *J. Phys. Chem.* 99:7787-7800.
- [120] Brown, L. S., J. Sasaki, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman és J. K. Lanyi (1995) *J. Biol. Chem.* 270:27122-27126.
- [121] Chang, C. H., J. G. Chen, R. Govindjee és T. G. Ebrey (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:396-400.
- [122] Dér, A., R. Tóth-Boconádi és L. Keszthelyi (1989) *FEBS Lett.* 259:24-26.
- [123] Ormos, P., D. Braunstein, B. Johnson, P. Steinbach és A. Xie (1990) 10th *Int. Biohys. Congress* 232.
- [124] Ormos, P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:473-477.
- [125] Váró, G. és J. K. Lanyi (1995) *Biochemistry* 34:12161-12169.
- [126] Subramaniam, S., M. Gerstein, D. Osterhelt és R. Henderson (1993) *EMBO J.* 12:1-8.
- [127] Stoeckenius, W. és R. Bogomolni (1982) *Annu. Rev. Biochem* 52:587-616.
- [128] Kouyama, T., A. Nasuda-Kouyama, A. Ikegami, M. K. Mathew és W. Stoeckenius (1988) *Biochemistry* 27:5855-5863.
- [129] Fodor, S. P. A., J. B. Ames, R. Gebhard, E. M. van den Berg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg és R. A. Mathies (1988) *Biochemistry* 27:7097-7101.
- [130] Balashov, S. P., E. S. Imasheva, F. F. Litvin és R. H. Lozier (1990) *FEBS Lett.*

271:93-96.

- [131] Otto, H., T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana és M. P. Heyn (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9228-9232.
- [132] Bousché, O., M. Braiman, Y. W. He, T. Marti, H. G. Khorana és K. J. Rotschild (1991) *J. Biol. Chem.* 266:11063-11067.
- [133] Pfefferle, J. M., A. Maeda, J. Sasaki és T. Yoshizava (1991) *Biochemistry* 30:6548-6556.
- [134] Száraz, S., D. Oesterhelt és P. Ormos (1994) *Biophys. J.* 67:1706-1712.
- [135] Groma, G. I., Z. Dancsházy (1986) *Biophys. J.* 50:357-366.
- [136] Hender, R. W., Z. Dancsházy, S. Bose, R. J. Shrager és Z. Tokaji (1994) *Biochemistry* 33:4604-4610.
- [137] Tokaji, Z. és Z. Dancsházy (1992) *FEBS Lett.* 311:267-270.
- [138] Dancsházy, Z. és Z. Tokaji (1993) *Biophys. J.* 65:823-831.
- [139] Li, Q., R. Govindjee és T. G. Ebrey (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7079-7082.
- [140] Zimányi, L., Y. Cao, R. Needleman, M. Ottolenghi és J. K. Lanyi (1993) *Biochemistry* 32:7669-7678.
- [141] Druckmann, S., M. P. Heyn, J. K. Lanyi, M. Ottolenghi és L. Zimányi (1993) *Biophys. J.* 65:1231-1234.
- [142] Cao, Y., L. S. Brown, R. Needleman és J. K. Lanyi (1993) *Biochemistry* 30:10972-



10979.

- [143] Smith, S. O., J. A. Pardoen, P. P. J. Mulder, B. Curry, J. Lugtenburg és R. A. Mathies (1983) *Biochemistry* 22: 6141-6148.
- [144] Chernavskii, D. S., J. V. Chizhov, R. H. Lozier, T. M. Murina, A. M. Prokhorov és B. V. Zubov (1989) *Photochem. Photobiol.* 49:649-653.
- [145] Chizhov, J., M. Engelhard, D. S. Chernavskii, B. Zubov és B. Hess (1992) *Biophys. J.* 61:1001-1006.
- [146] Drachev, L. A., A. D. Kaulen, V. P. Skulachev és V. V. Zorina (1986) *FEBS Lett.* 209:316-320.
- [147] Váró, G. és J. K. Lanyi (1990) *Biochemistry* 29:6858-6865.
- [148] Cao, Y., L. S. Brown, R. Needleman és J. K. Lanyi (1993) *Biochemistry* 32:7679-7685.
- [149] Oesterhelt, D. és B. Hess (1973) *Eur. J. Biochem.* 37:316-326.
- [150] Kalisky, O., M. Ottolenghi, B. Honig és R. Korenstein (1981) *Biochemistry* 20:649-655.
- [151] Druckmann, S., M. Ottolenghi, A. Paude, J. Paude és R. H. Callender (1982) *Biochemistry* 21:4953-4959.
- [152] Baasov, T. és M. Sheves (1986) *Biochemistry* 25:5249-5258.
- [153] Chronister, E. L., T. C. Corcoran, L. Song és M. A. El-Sayed (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8580-8584.

- [154] Schulten, K., Z. Schulten és P. Tavan (1984) *Information and Energy Trasduction in Biological Membranes*, Bolis, C. L., E. J. M. Helmreich és H. Passov; kiadó: Alan R. Liss 113.
- [155] Orlandi, G. és K. Schulten (1979) *Chem. Phys. Lett* 64:370-374.
- [156] Tavan, P., K. Schulten és D. Oesterhelt (1985) *Biophys. J.* 47:415-430.
- [157] Dencher, N. A., J. Heberle, G. Büldt, H-D. Höltje és M. Höltje (1992) *Membrane Proteins: Structures, Interactions and Models*; kiadók Pullman, A., J. Jortner és B. Pullman: 69-84.
- [158] Huang, K. S., H. Bayley, M. J. Liao, E. London és H. G. Khorana (1981) *J. Biol. Chem.* 256:3802-3809.
- [159] London, E. és H. G. Khorana (1982) *J. Biol. Chem* 257:7003-7011.
- [160] Gilles-Gonzalez, M. A., N. R. Hackett, S. J. Jones, H. G. Khorana, D. S. Lee, K. M. Lo és J. M. McCoy (1986) *Methods. Enzymol.* 125:190-214.
- [161] Mitra, A. K., L. J. W. Miercke, G. J. Turner, R. F. Shand, M. C. Betlach és R. M. Stroud (1993) *Biophys. J.* 65:1295-1306.
- [162] Ni, B., M. Chang, A. Duschl, J. K. Lanyi és R. Needleman (1990) *Gene* 90:169-172.
- [163] Brown, L. S., Y. Yamazaki, M. Maeda, L. Sun, R. Needleman és J. K. Lanyi (1994) *J. Mol. Biol.* 239:401-414.
- [164] Kataoka, M., H. Kamikubo, F. Tokunaga, L. S. Brown, Y. Yamazaki, A. Maeda, M. Sheves, R. Needleman és J. K. Lanyi (1994) *J. Mol. Biol.* 243:621-638.
- [165] Otto, H., T. Marti, M. Holz, T. Mogi. L. J. Stern, F. Engel, H. G. Khorana és M.

- P. Heyn (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1018-1022.
- [166] Thorgeisson, T. E., S. J. Milder, L. J. W. Miercke, M. C. Betlach, R. T. Shand, R. M. Stroud és D. S. Kliger (1991) *Biochemistry* 30:9133-9142.
- [167] Tittor, J., U. Schweiger, D. Oesterhelt és E. Bamberg (1994) *Biophys. J.* 67:1682-1690.
- [168] Marinetti, T., S. Subramaniam, T. Mogi, T. Marti és H. G. Khorana (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:529-533.
- [169] Moltke, S., M. P. Heyn, M. P. Krebs, R. Mollaaghababa és H. G. Khorana (1992) *Structures and Functions of Retinal Proteins; kiadó J. L. Rigaud: 201.*
- [170] Braiman, M. S., A. L. Kliger és R. Doebler (1992) *Biophys. J* 62: 56-58.
- [171] Cao, Y., L. S. Brown, R. Needleman és J. K. Lanyi (1993) *Biochemistry* 32:10239-10248.
- [172] Brown, L. S., G. Váró, M. Hatanaka, J. Sasaki, H. Kandori, A. Maeda, N. Friedman, M. Sheves., R. Needleman és J. K. Lanyi (1995) *Biochemistry* 34:12903-12911.
- [173] Mogi, T., L. J. Stern, N. R. Hackett és H. G. Khorana (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4148-4152.
- [174] Braiman, M. S., T. Mogi, L. J. Stern, R. D. Hackett, B. H. Chao és H. G. Khorana (1988) *Proteins* 3:219-229.
- [175] Ahl, P. L., L. J. Stern, D. During, T. Mogi, H. G. Khorana és K. J. Rotschild (1988) *J. Biol. Chem.* 263:13594-13601.

- [176] Ahl, P. L., L. J. Stern, T. Mogi, H. G. Khorana és K. J. Rotschild (1989) *Biochemistry* 28:10028-10034.
- [177] Yamazaki, Y., J. Sasaki, M. Hatanaka, A. Maeda, H. Kandori, R. Needleman, T. Shinada, K. Yoshihara, L. S. Brown és J. K. Lanyi (1995) *Biochemistry* 34:577-582.
- [178] Subramaniam, S., D. A. Greenholgh, P. Rath, K. J. Rotschild és H. G. Khorana (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6873.
- [179] Tittor, J., M. Wahl, U. Schweiger és D. Oesterhelt (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1187:191-197.
- [180] Miller, A. és D. Oesterhelt (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1020:57-64.
- [181] Tittor, J., C. Soell, D. Oesterhelt, H.-J. Butt és E. Bamberg (1989) *EMBO J.* 8:3477-3482.
- [182] Humprey, W., I. Logunov, K. Schulte és M. Sheves (1994) *Biochemistry* 33:3668-3678.
- [183] Marti, T, H. Otto, T. Mogi, S. J. Rösselet, M. P. Heyn és H. G. Khorana (1991) *Biol. Chem.* 266:6919.
- [184] Rotschild, K. J., Y.-W. He, S. Sonar, T. Marti és H. G. Khorana (1992) *J. Biol. Chem* 267:1615-1622.
- [185] Lin, G. C., M. A. El-Sayed, T. Marti, L. J. Stern, T. Mogi Es H. G. Khorana (1991) *Biophys. J.* 60:172-178.
- [186] Drachev, L. A., A. D. Kaulen, H. G. Khorana, T. Mogi, N. V. Postanogova, V. P. Skulachev és L. J. Stern (1992) *Photochem. Photobiol.* 55:741-744.

- [187] Brown, L. S., G. Váró, R. Needleman és J. K. Lanyi (1995) *Biophys. J.* 69:2103-2111.
- [188] Dancsházy, Z. és B. Karvaly (1976) *FEBS Lett* 72:136-138.
- [189] Drachev, L. A., A. D. Kaulen, A. Y. Semenov, I. I. Severina és V. P. Skulachev (1979) *Anal. Biochem.* 96:250-262.
- [190] Bamberg, E. és A. Fahr (1980) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 358:324-327.
- [191] Trissl, H.-W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 723:327-331.
- [192] Keszthelyi, L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 598:429-436.
- [193] Keszthelyi, L. és P. Ormos (1989) *J. Membrane Biol.* 109:193-200.
- [194] Dér, A., P. Hargittai és J. Simon (1985) *J. Biochem. Biophys. Methods* 10:295-300.
- [195] Turner, G. J., J. W. Miercke, T. E. Thorgerisson, D. S. Kliger, M. C. Betlach és R. M. Stroud (1993) *Biochemistry* 32:1332-1337.
- [196] Váró, G. és L. Keszthelyi (1983) *Biophys. J.* 43:47-51.
- [197] Keszthelyi, L. és P. Ormos (1983) *Biophys. Chem.* 18:397-405.
- [198] Lanyi, J. K., J. Tittor, G. Váró, G. Krippahl és D. Oesterhelt (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1009:102-110.
- [199] Bagyinka, Cs., J. P. Whitehead és M. J. Maroney (1993) *J. Am. Chem. Soc* 115:3576-3585.
- [200] Golub, G. és W. Kahan (1965) *SIAM J. Numer. Anal.* 2:205-224.

- [201] Cao, Y., G. Váró, A. L. Klinger, D. M. Czajkowsky, M. S. Braiman, R. Needleman és J. K. Lanyi (1993) *Biochemistry* 32:1981-1990.
- [202] Dencher, N. A., Ch. N. Rafferty és W. Sperling (1976) *Berichte der Kernforschungsanlager Julich GmbH* 1-42.
- [203] Korenstein, R. és B. Hess (1977) *FEBS Lett* 82:7-11.
- [204] Logunov, I., W. Humphrey, K. Schulten és M. Sheves (1994) *Biophys. J.* 68:1270-1282.
- [205] Váró, G. (1987) *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 22:99-105.
- [206] Diller, R., M. Iannone, R. Bogomolni és R. M. Hochstrasser (1991) *Biophys. J.* 60:286-289.
- [207] Koch, M. H. J., N. A. Dencher, D. Oesterhelt, H. J. Plöhn, G. Rapp és G. Büldt (1991) *EMBO. J.* 1:521-526.
- [208] Holz, M., L. A. Drachev, T. Mogi, H. Otto, A. D. Kaulen, M. P. Heyn, V. Skulachev és H. G. Khorana (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2167-2171.
- [209] Cao, Y., G. Váró, M. Chang, B. F. Ni, R. Needleman és J. K. Lanyi (1991) *Biochemistry* 30:10972-10979.
- [210] Dér, A., R. Tóth-Boconádi és S. Száraz (1992) *Structures and Functions of Retinal Proteins; kiadó J. L. Rigaud, John Libbey és Co., London* 197-200.
- [211] Lohrmann, R. és M. Stockburger (1992) *Structures and Functions of Retinal Proteins; kiadó J. L. Rigaud, John Libbey és Co., London* 147-150.
- [212] Rotschild, K. J. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* 24:147-167.

- [213] Brickmann, J. (1976) *The Hydrogen Bond, Recent Developments in Theory and Experiments*; kiadók P. Schuster, G. Zundel és C. Sandorfy. North-Holland Publishing Co., N. Y. 219-244.
- [214] Zhou, F.M., A. Windemuth és K. Schulten (1993) *Biochemistry* 32:2291-2306.
- [215] Váró, G., L. Zimányi, X. Fan, L. Sun, R. Needleman és J. K. Lanyi (1995) *Biophys. J.* 68:2062-2072.
- [G1] Gergely, C. és G. Váró (1992) *Structures and Function of Retinal Proteins*; kiadó J. L. Rigaud 221:193-196.
- [G2] Gergely, C., C. Ganea, S. Száraz és G. Váró (1995) *J. Photochem. Photobiol.* 27:27-32.
- [G3] Gergely, C. és G. Váró (1992) *Biophys. Membrane Transport, School Proc. Poland* 288.
- [G4] Gergely, C., C. Ganea és G. Váró (1994) *Biophys. J.* 67:855-861.
- [G5] Gergely, C., C. Ganea, G. Groma és G. Váró (1993) *Biophys. J.* 65:2478-2483.
- [G6] Ganea, C., C. Gergely és G. Váró (1995) *Electro and Magnetobiol.* 14:229-241.
- [G7] Ganea, C., C. Gergely és G. Váró (1993) *Romanian J. of Biophys.* 3:133-143.
- [G8] Gergely, C., A. Dér, S. Száraz és L. Keszthelyi (1992) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28:149-157.