

**A BAKTERIORODOPSZIN, MINT LEHETSÉGES  
ANIONPUMPA**

Egyetemi doktori értekezés

**SZÁRAZ SÁNDOR**

Szeged

**1992.**

## TARTALOMJEGYZÉK:

1. BEVEZETÉS: .....	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS: .....	4
2.1 A bakteriorodopszin szerkezete: .....	4
2.1.1 A bñbormembrán szerkezete .....	4
2.1.2 Az opszin szerkezete .....	5
2.1.3 A kromofór és környezete .....	8
2.2 A protonpumpa kinetikája: .....	12
2.2.1 A fényabszorpciós ciklus .....	13
2.2.2 A retinál ciklus .....	15
2.2.3 Az opszin ciklus .....	17
2.2.4 A töltésmozgás ciklus .....	19
2.3 A proton-transzlokáció mechanizmusa .....	23
3. A HALORODOPSZIN: Összehasonlítás a bakteriorodopszinnal ....	24
4. CÉLKITŰZÉS .....	29
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK: .....	30
5.1 Mintakészítés .....	30
5.2 A mérőeszközök leírása .....	30
5.3 A tranziens fotoelektromos jelek kiértékelése .....	33
6. EREDMÉNYEK: .....	36
6.1 Az abszorpciós spektrum pH, illetve ionfüggése .....	36
6.2 Az elektromos jelek pH, illetve ionfüggése .....	39
7. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE .....	47
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	54
9. IRODALOMJEGYZÉK .....	55

## 1. BEVEZETÉS:

Az élő szervezetek működése, belső rendje nem lenne fenntartható, ha a sejtek nem volnának képesek környezetükből energiát felvenni. Ennek az energiának a szervezet számára közvetlenül felhasználható energiafajta való átalakítását magasan szervezett enzim- és más fehérje-komplexeket tartalmazó membránok végzik.

Valamennyi energiaátalakító membránban közös, hogy tartalmaz funkciójára nézve kétféle fehérje komplexet. Ezek közül az egyik az ún. ATP-szintetáz, amely az ATP keletkezését katalizálja ADP-ből és szervetlen foszfátból, míg a második komplex feladata, hogy a környezetből hozzáférhető energiaforrásból a sejt számára közvetlenül felhasználható energiát állítson elő. Ma már általánosan elfogadott a Mitchell-féle kemiozmotikus hipotézis [1], amely szerint a fenti alapegységek működése a membrán két oldala között létrejövő iongradiens (ion elektrokémiai potenciál) révén kapcsolódik össze. Ily módon mindkét komplex lényegében egy ionpumpának tekinthető, az egyiket pl. az elektrontranszfer lánc, vagy fény hajtja, és iongradienst hoz létre, a másik pedig az ionok "visszacsorgatásával" ATP-t szintetizál. A Mitchell-féle kemiozmotikus hipotézis jelentősége, hogy lehetőséget nyújt sejtszintű bioenergetikai számítások elvégzésére. Az iontranszport molekuláris mechanizmusa azonban még távolról sem tekinthető ismertnek.

Egy igen egyszerű, fényenergia felhasználásával működő protonpumpát valósít meg a dolgozat tárgyát képező fehérjemolekula, a bakteriorodopszin (bR), amelyet a 70-es évek elején Oesterhelt és Stoeckenius fedeztek fel [2]. A témával kapcsolatosan több összefoglaló dolgozat is megjelent [3,4,5,6].

A bR molekula a *Halobacterium halobium* nevű sókedvelő baktérium bíbormembránjában (BM) található. A baktérium természetes körülmények között csak közel telített sókoncentrációjú, napfényes állóvizekben él [7]. Oxigénben és tápanyagban dús környezetben oxidatív foszforilációval termel

magyarul  
lánc  
módozat

ATP-t, anaerob körülmények között azonban fényenergia hasznosítására kapcsol át. Pigmentje a napfény spektrumának maximuma közelében abszorbeál a legerősebben (~570 nm), és a fotoreakcióban a fény energiájának hasznosításával a membrán két oldala között elektrokémiai energiát képviselő protongradiens alakul ki. A protonok az ATP-szintetázon keresztül áramlanak vissza a sejtbe, miközben ATP termelődik.

A bR kutatást három fő ok motiválja:

a, egyedülálló módon hajtja végre az energia-átalakítást, - mint később látni fogjuk - minden más ismert mechanizmusnál egyszerűbben.

b, a protonpumpa folyamatainak molekuláris szintű megismerése minden bizonnyal olyan új fizikai és kémiai szintű alapelvekhez vezet, amely más ionpumpák működésének megértéséhez hozzásegít.

c, a bR sok szerkezeti és működésbeli hasonlóságot mutat az állatok szemében található rodopszinnal.

A fenti sajátosságok mellett gyakorlati okok is indokolják, hogy a bR ilyen széleskörben kutatott. Például a bR-t tartalmazó BM más fehérjékhez képest könnyen izolálható, a preparátum időben rendkívül stabil. A protonpumpa működésének vizsgálata akár desztillált vízben is történhet (sőt, a transzport-folyamat bizonyos lépései még teljesen kiszárított mintákon is tanulmányozhatók), így a kísérleti körülmények jól kontrollálhatók.

Desztillált vízben hogyan működik a proton-pumpa, hiszen a pH nem is definiálható?

A bakteriorodopszin mellett három másik retinál-tartalmú fehérjét is azonosítottak a Halobacterium halobium-ban. Ezek közül kettő - az ún. szenzori rodopszinok (SR-I, SR-II) - a megvilágító fény színösszetételét érzékelik és a sejt fototaxisának szabályozásában játszanak szerepet [8,9,10].

A harmadik pigment - az ún. halorodopszin (hR) - a bR-hoz hasonlóan fényenergiát alakít elektrokémiai gradienssé, de nem protonokat, hanem Cl<sup>-</sup> ionokat pumpál [11,12,13]. A két pigment (bR és hR) abszorpciós maximuma nagyon közel esik egymáshoz. Aminosav-sorrendjeiket összehasonlítva nagyfokú, mintegy 36%-os homológia állapítható meg, ami a térszerkezet hason-

lóságát is maga után vonja.

A fentiek alapján kézenfekvő feltenni a kérdést, hogy vajon mi határozza meg azt, hogy a bR protonokat, a hR pedig  $\text{Cl}^-$  ionokat pumpál? bR mutánsok vizsgálata alapján egyértelműnek tűnik a válasz arra, hogy miért nem képes a hR protonok transzportjára. Ezzel szemben sokkal nehezebb azt megmagyarázni, hogy a bR miért nem pumpál anionokat [14]. \*

Miért?  
Intracelmi  
hivatkozón  
keletlene  
vagy le  
keletene  
láthatni  
az olva-  
sával.

A dolgozatban ismertetett kísérletek során ezt a nagyon érdekes kérdést vizsgáltuk meg, nevezetesen megpróbáltuk kideríteni, hogy milyen tényezők határozzák meg a bR ionspecifitását. Sikerült ugyanis olyan körülményeket teremtenünk, amelyek között az eddig csak protonpumpaként ismert bR nagy valószínűséggel aniontranszportra ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) kapcsol át. A kísérleti eredmények értelmezése kapcsán felvázolunk egy olyan, az egyéb ismeretekkel is egyezésben álló modellt, amely ésszerű magyarázatot ad arra, hogy ugyanaz a fehérje hogyan lehet képes mind<sup>a</sup> proton, mind<sup>a</sup> halogenid ionok transzportjára.

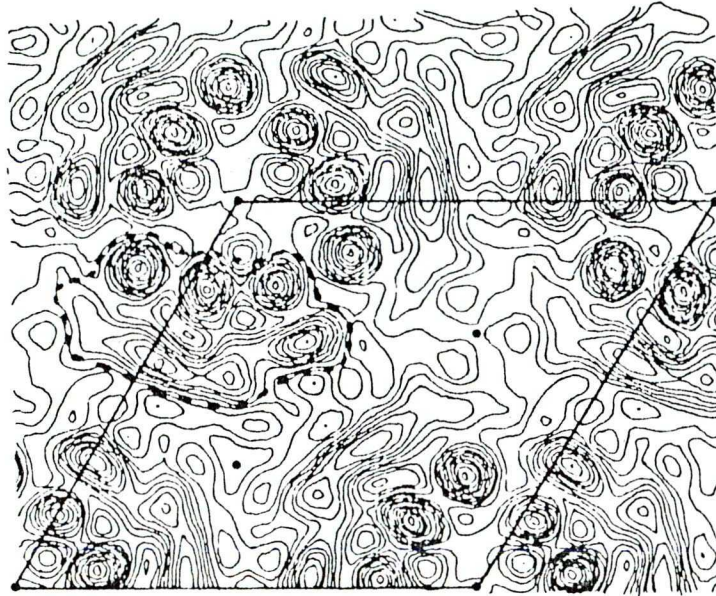
\* Pl. azért, mert nincsen anionkötő helyei

hR:  $\text{Cl}^-$  az A és B helixek közötti Arg-<sup>1</sup> és Arg-<sup>2</sup> között, átmenet a fehérjén a Schiff bázisra, majd a citoplazmikus oldal Arg-<sup>1</sup> tartalmazó oldalán váltak le.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS:

### 2.1 A BAKTERIORODOPSZIN SZERKEZETE:

#### 2.1.1 A bíbormembrán szerkezete:



#### 1. ábra:

**A bíbormembrán elektrondiffrakciós vizsgálatok alapján származtatott képe a membrán normálisának irányából nézve.**

A szaggatott vonal egy bR molekulát határol, a folytonos vonal pedig a hexagonális rács egy elemi celláját jelöli.

A bR molekulák a *Halobacterium halobium* sejtek membránjában jól elkülönülő szigetekbe tömörülnek, amelyeket színük miatt bíbormembránoknak (BM) neveznek. Ezek elektronsűrűségi képe az 1. ábrán látható [15].

Mivel a baktérium közel telített koncentrációjú sós vízhez alkalmazkodott,

így a natív sejtek tiszta vízben ozmotikusan szétrobbannak, és a bR-t tartalmazó membránok centrifugálással viszonylag könnyen elkülöníthetők.

A kizárólag lipideket (25 tömegszázalék) és bR-t tartalmazó BM-ok átlagos átmérője  $\sim 0.5 \mu\text{m}$ , vastagsága  $\sim 4.9 \text{ nm}$  [16]. A bR molekulák a BM-ban kétdimenziós, hexagonális kristályszerkezetbe rendezettek, amelynek rácsállandója  $\sim 6 \text{ nm}$ . Az egyes rácspontokban három bR molekula ül, amelyeket együttesen trimernek neveznek. A későbbiek szempontjából nagyon fontos az, hogy ezek a membránok többé-kevésbé korong alakúnak képzelhetők, ugyanis a nagy fehérje-tartalom miatt eléggé merevek ahhoz, hogy még oldatban se záródjanak össze vezikulákká.

*Ennek a  
merektség  
vagy az  
elektronos  
töltöttség  
az oka?*

### 2.1.2 Az opszin szerkezete:

A bR egy 248 aminosav-egységből álló fehérje, amely egy apoproteinből - az ún. opszinből -, és egy ebbe ágyazódó retinál kromofórból áll. Az elsődleges szerkezetet (2. ábra) mind a fehérjéből [17,18], mind az azt kódoló génből [19] meghatározták.

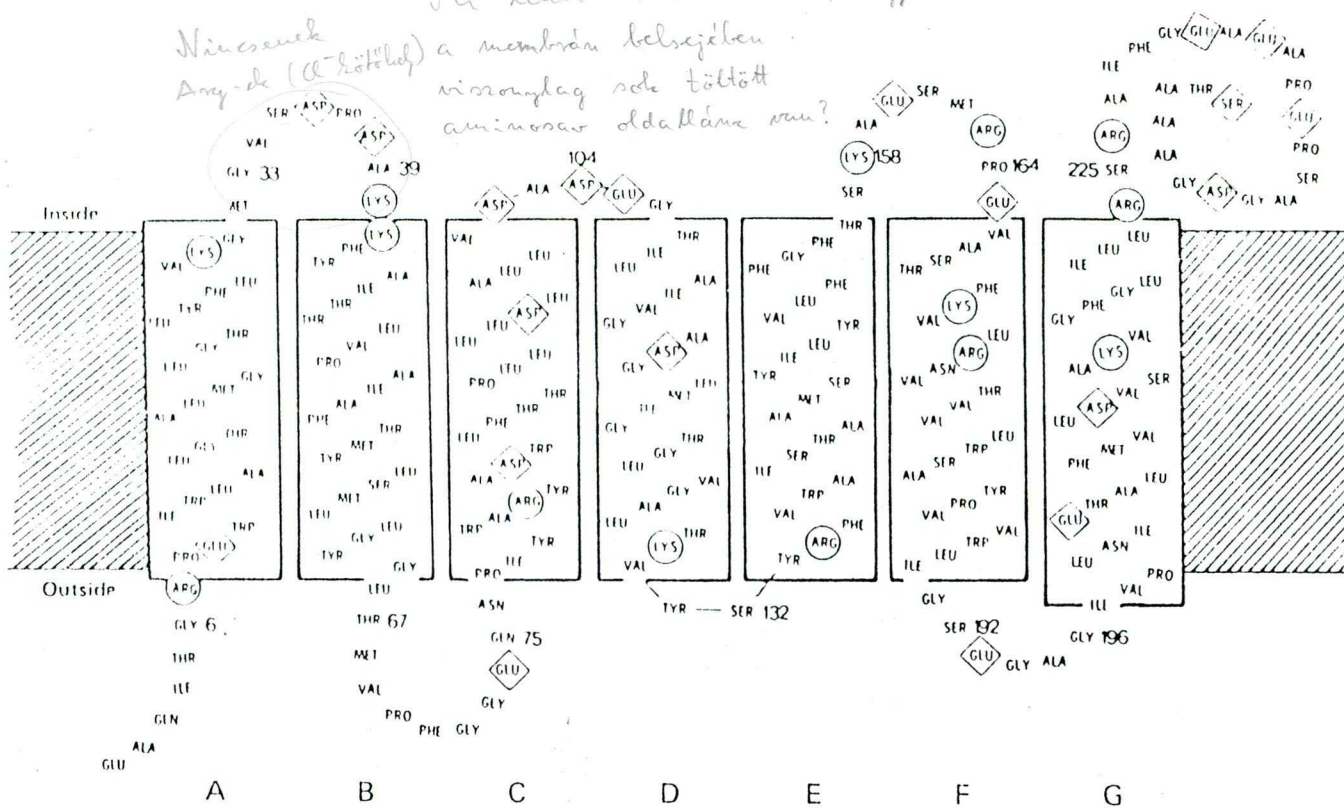
Henderson és munkatársai fokozatosan javított krio-elektronmikroszkópiai, mintakészítési és adatfeldolgozási módszerekkel építették fel a bR háromdimenziós elektronsűrűségi térképét, 0.35 nm feloldással a membrán síkjával párhuzamos, illetve 1 nm feloldással az arra merőleges irányban [20,21]. Az általuk közölt szerkezet felhasználásával készített egyszerűsített modellt a 3. ábra mutatja.

Egy bR molekulában hét, a membrán síkjára közel merőleges  $\alpha$ -hélix található, amelyek a membránt átszelik. Ezek a hélixek egy csatornát fognak körül, amelyet a Lys-216 oldalláncához kapcsolódó retinál és a környezetét alkotó hidrofób burok mintegy eltorlaszol [22]. A csatornának a retinált és a sejten kívüli teret összekötő része szélesebb, és sokkal inkább hidrofil [21]. Az elektronsűrűségi képen az egyes hélixek azonosítása a jól felismerhető aromás

Tudtommal csak egy hidrofíli csoport van (lásd a 3. ábrát)

Mi lehet az oka annak, hogy

Nincsenek Arg-ek (α-kötés) a membrán belsőjében  
viszonylag sok töltött aminosav oldallánca van?



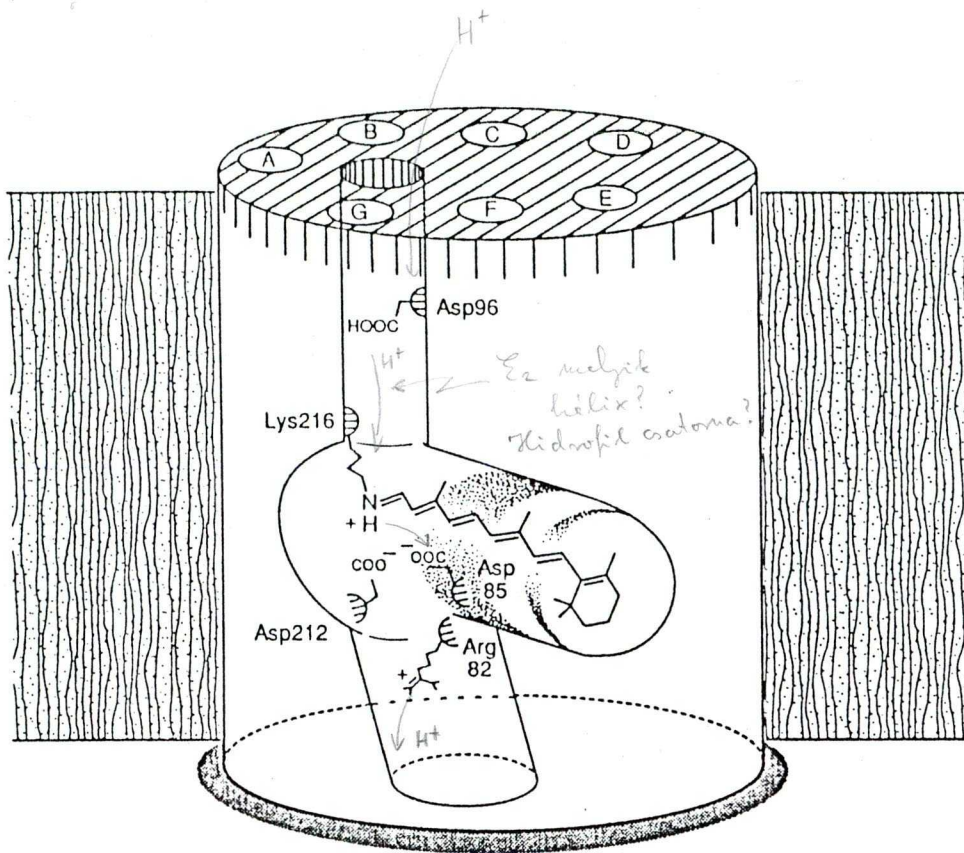
2. ábra:

A bR aminosav szekvenciája.

A körök a pozitívan, a rombuszok a negatívan töltött csoportokat jelzik.

aminosavak elhelyezkedésének az aminosav-sorrenddel való összevetése révén történt. Továbbá mivel az elektronsűrűségi képen csak a retinál jonon-gyűrűjét lehetett felismerni, így a kromofórt egyéb, korábbi ismeretek alapján lehetett csak a szerkezetbe beilleszteni (lásd a 21-ben idézett referenciákat). A membránra merőleges irányra kapott viszonylag gyengébb feloldás miatt a fehérje oldallánca helyzetének meghatározása csak körülbelül egy aminosav-egységnyi pontossággal lehetséges. Így míg azt például lehet tudni, hogy milyen egységek helyezkednek el a Schiff-bázis közelében, a hidrogén és sóhid kötések már meglehetősen spekulatívak.





3. ábra:

A bR vázlatos háromdimenziós szerkezete.

Az Asp-85, 96, 115, Arg-82, Tyr-185, Pro-186, illetve Trp-86, 182, 189 aminosav-egységek a fehérje belsejében helyezkednek el, és ezek alkotják azt az üreget, amelybe a kromofór beágyazódik.

A retinál molekula egy protonált Schiff-bázison keresztül kovalensen kapcsolódik a G hélix Lys-216 egységéhez [23,24] (3. ábra). Megvilágítás hiányában a bR egy ún. sötétadaptált állapotba relaxál, amely a bR<sub>548</sub> és a bR<sub>568</sub>

Mintha a rajzon egy G-től független hélixen lenne a Lys-216 és a többi kationikus aminosav



állapotok 2:1 arányú keveréke [25] (az alsó indexben szereplő számok az illető állapot abszorpciós maximumára utalnak, lásd pl. 4. ábra). A  $bR_{548}$  formában a retinál szerkezete 13-cisz C=N-szün, míg a  $bR_{568}$ -ban all-transz, C=N-anti. Megvilágítás hatására az ún. fényadaptált bR alakul ki, amely csak  $bR_{568}$ -at tartalmaz. Funkcionálisan csak a  $bR_{568}$  állapot aktív, azaz csak ez pumpál protont.

A retinál fehérjén belüli elhelyezkedését számos módszerrel vizsgálták. Neutron-diffrakciós kísérletekkel meghatározták, hogy a Schiff-bázis nitrogén atomja a C és G hélixek között körülbelül félúton helyezkedik el, míg a ciklohexán gyűrű az E hélix közelében fekszik [26]. A membrán síkjához képest a kromofór síkja merőlegesen [27,28], míg a polién lánc tengelye  $\sim 20^\circ$ -os szögben áll [29,30,31]. A sejten kívüli oldaltól számítva a jonon-gyűrű  $\sim 0.9$  nm, a Schiff-bázis  $\sim 1.5$  nm mélységben található [32].

### 2.1.3 A kromofór és környezete:

A fényadaptált bR ( $bR_{568}$ ) abszorpciós maximuma a Schiff-bázis metanolban oldott klorid sójának abszorpciós maximumához képest nagymértékű vöröseltolódást ( $\sim 200$  nm) mutat (4. ábra). Ez az ún. opszin-eltolódás [33] a fehérje hatására jön létre, a retinál környezetének és térszerkezetének megváltoztatása révén.

Az opszin-eltolódás mértékét három tényező határozza meg:

1. A fehérje belsejében megjelenő kölcsönhatások, ezen belül főként a Schiff-bázis és egy, a közelében lévő ellenion közötti gyenge hidrogén-kötés erőssége [34,35,36,37]. Ennek a képnek megfelelően a fehérje abszorpciós maximuma a Schiff-bázis környezetének változtatásával modulálható.
2. Amikor a retinál a fehérjébe bekötődik, a  $C_6$ - $C_7$  kötés mentén végbemegy egy s-cisz  $\rightarrow$  s-transz izomerizáció, ami a konjugált elektronok nagyobb mértékű delokalizációjához vezet, és ez szintén hozzájárul az opszin-eltolódáshoz [38].

Ez az izomerizáció valószínűleg sztérikus okok következménye, mivel a bR retinál-kötőhelyének szerkezete olyan, hogy a 6-s-cisz szerkezetű retinál jonon gyűrűjén lévő két metil csoport a Met-118 és Pro-186 egységek közelében a D és F hélixekkel ütközne [6].

3. Valószínűleg egy, a jonon gyűrű közelében elhelyezkedő dipoláros fehérjecsoport szintén hozzájárul az opszin-eltolódáshoz [39]. A Trp-138, Pro-186 pár, illetve az Asp-115 protonált karboxil csoportja jöhetnek számításba [40]. Az Asp-115 aszparaginra, vagy glutaminsavra cserélésekor valóban észlelhető egy ~20 nm-es kékeltolódás az abszorpciós maximumban [41,42].

A retinál-kötőhely szerkezete a Henderson-féle modell alapján elég jól meghatározott. A Trp-86, 182 és 189 szerepe az, hogy a retinál polién láncát megfelelő pozícióban tartsák [43]. Az ezeknek megfelelő aminosav egységek megtalálhatók mind a halorhodopszinban, mind a szenzorirodopszinban (SR-I) [44,45]. A fenti triptofán egységek bármelyikének kicserélése instabilabb fehérjeszerkezetet, az abszorpciós spektrum kékeltolódását és csökkent transzportsebességet eredményez [46]. A Trp-182 és Trp-86 a retinál polién láncának közepe fölött, illetve alatt helyezkednek el, szerepük feltehetőleg a kromofór elmozdulásának megakadályozása a membrán normálisának irányába, míg a Trp-189 és Pro-186 a jonon gyűrű mozgását korlátozzák. Nagyon valószínű, hogy az ezekkel az egységekkel való sztérikus kölcsönhatás határozza meg, hogy a retinál a fotociklus során a  $C_{13}=C_{14}$  kötés mentén izomerizálódik.

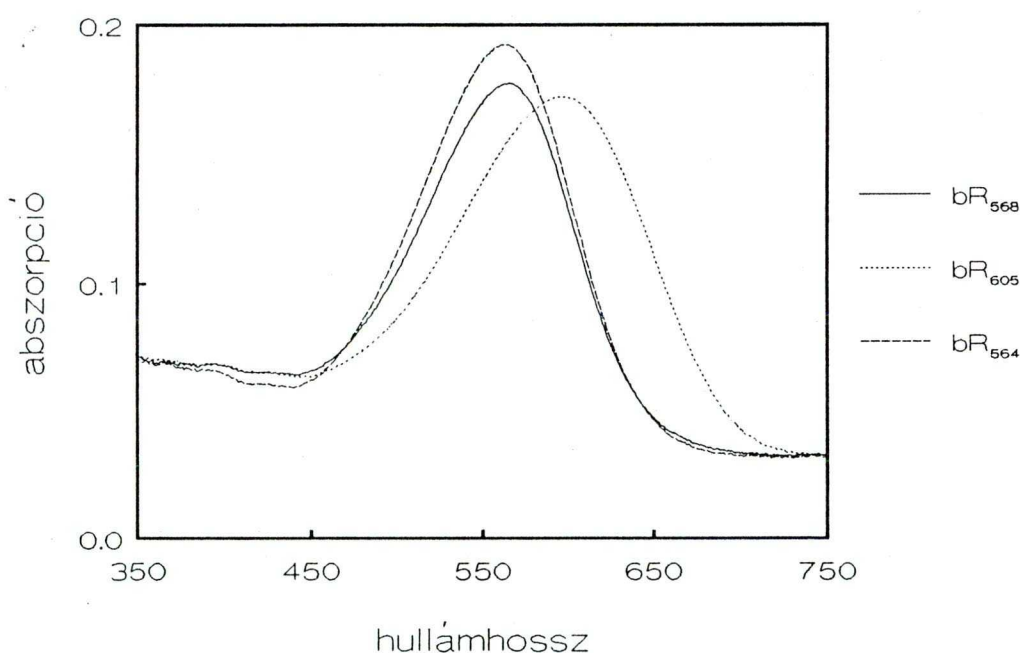
A Schiff-bázis környezetét alapvetően az Arg-82, Tyr-185, Asp-85 és 212 egységek határozzák meg [30,42,47]. Fiziológias körülmények között (pH=7) mind az Asp-85, mind az Asp-212 disszociált formában van jelen [48] és mindkettő alapvető fontosságú ahhoz, hogy a fehérje működőképes és stabil legyen [42]. Ha az Asp-85-öt semleges aszparaginra (Asn) cserélik, akkor az abszorpciós maximum a vörös felé tolódik el, ami megfelel egy negatív töltés eltávolításának a Schiff-bázis környezetéből. A hasonló Asp-212 → Asn mutáns vizsgálata a létrejövő fehérje instabilitása, illetve csekély mértékű fényadaptálha-

tósága miatt sajnos kevesebb következtetéssel szolgált [41,42]. A térszerkezet alapján valószínűbbnek tűnik, hogy a Schiff-bázis elsődleges ellenionja az Asp-212, amit az is támogat, hogy az ennek megfelelő aminosav-egység megtalálható mind a halorodopszinban ( $\lambda_{\max} = 578$  nm), mind a szenzorirodopszinban (SR-I,  $\lambda_{\max} = 590$  nm) [45]. A Schiff-bázis és ellenionja közötti hidrogénkötés viszonylagos gyengesége arra mutat, hogy a Schiff-bázis nem kizárólag az Asp-212-vel áll kölcsönhatásban, hanem egy töltéskomplexszel, amit az Asp-212<sup>-</sup>, Asp-85<sup>-</sup> és Arg-82<sup>+</sup> együttesen alkotnak [49,50]. Emellett az egyszerű ellenion létének kétfotonos és infravörös spektroszkópiai vizsgálatok is ellentmondanak [51,52]. Valószínű, hogy a hidrogénkötésben résztvevő csoportok közé néhány vízmolekula is beépül [53].

Az Arg-82 semleges aminosavra (glutamin, alanin) cserélése olyan bR-t eredményez, amelynek abszorpciós maximuma az 500 és 600 nm közötti (bíbor-kék) tartományban a pH-tól függően változik [42]. Hasonló kékeltozódást a természetes bR esetén is elő lehet idézni a kationok eltávolításával (pH $\approx$ 6) [54], illetve puffer, vagy só jelenlétében a közeg pH-jának csökkentésével (pH $\approx$ 2) [55] (4. ábra). Többen javasolták, hogy ez a kékmembrán (bR<sub>605</sub>,  $\lambda_{\max} = 605$  nm), olyan - specifikus kötőhelyeken lévő - kationok eltávolításának eredménye, amelyek szerepet játszanak a fehérje bíborszínű állapotának stabilizálásában [56,57,58]. Létezik azonban egy ennél lényegesen egyszerűbb magyarázat is, amelyhez nincsen szükség a fenti, egyébként igen ellentmondásosan jellemzett kation-kötőhelyek feltételezésére [59]. Ez azon alapul, hogy alacsonyabb kation koncentrációjú, semlegeshez közeli pH-jú oldatok esetén a negatívan töltött membrán felületének közelében a lokális pH a közeghez képest lecsökken (pH $\approx$ 3). Puffer, illetve só jelenlétében azonban hasonló felületi pH értéket csak a közeg pH-jának drasztikus csökkentésével lehet elérni. Feltehetően - a pH csökkenésével - a fehérjeszerkezet kismértékű megváltozása következik be, amelynek során gyengül a Schiff-bázis és ellenionja közötti kölcsönhatás, és ez az abszorpciós maximum vörös felé tolódását eredményezi

[60,61,62]. A kékmembrán, az Asp-85 → Asn és az Arg-82 → Ala mutáns alacsony pH-n észlelhető formájának nagyon hasonló abszorpciós maximuma azt sugallja, hogy az Arg-82 elsődleges szerepe, hogy az Asp-85 deprotonált állapotát<sup>ak</sup> stabilizálja [63,42].

A pH további csökkentésével (< 2), halogenid ionok jelenlétében egy újabb, savas-bíbor bR-nak (bR<sub>564</sub>) nevezett forma is kialakul [64,65,66], amelynek abszorpciós maximuma 564 nm-nél található (4. ábra). Ez a forma hasonlóságot mutat a semleges pH-n megjelenő bR<sub>568</sub> formával, amelyre az abszorpciós spektrumok hasonlóságából, illetve abból lehet következtetni, hogy a retinál izomerizációja a savas-bíbor állapotban is all-transz.



#### 4. ábra:

A bR savas pH-n megjelenő formáinak abszorpciós spektrumai.

A spektrumokat az alábbi körülmények között mértük:  
 bR<sub>568</sub> (normál): 4 M KCl, pH=7 (HCl); bR<sub>605</sub> (savas-kék): ionmentes, pH=2 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); bR<sub>564</sub> (savas-bíbor): 4 M KCl, pH=0 (HCl).

## 2.2 A PROTONPUMPA KINETIKÁJA:

A bR működése során - miközben fényenergia felhasználásával protonokat pumpál a sejt belsejéből az extracelluláris térbe - egy fényindukált reverzibilis reakción megy végig, amelyet fotociklusnak nevezünk [67]. A fehérje foton elnyelésének hatására kialakuló gerjesztett állapota rendkívül gyorsan,  $\sim 0.5$  ps alatt megjelenik. Ez az állapot ezután termikus reakciók sorozatán keresztül - szobahőmérsékleten és pH=7-en -  $\sim 5-10$  ms alatt relaxál. A bR-nek a fotociklus során megjelenő különböző állapotait intermediereknek, illetve formáknak is hívják. Ezeket megjelenésük sorrendjében - J-től O-ig - betűjelekkel látták el (szokás az illető forma abszorpciós maximumának helyét alsó indexben megadni). A különböző kísérletekben megfigyelt jelenségektől függően többféle fotociklusról szokás beszélni, de ezek természetesen szoros korrelációban vannak egymással, mivel a bR funkciójához, a protonpumpáláshoz kapcsolódnak.

Ily módon négyféle különböző ciklust lehet megkülönböztetni:

1. *A fényabszorpciós ciklus.* Az elsőként jellemzett ciklus, amely azon a megfigyelésen alapul, hogy a létrejövő intermedierek látható tartománybeli abszorpciós spektruma eltérő. Ennek oka - mint korábban említettük -, hogy a kromofór abszorpciós spektruma a környezetében végbemenő változásokra rendkívül érzékeny. A fény- és sötétadaptált bR fotociklusa némileg eltérő és csak az all-transz kromofórt tartalmazó bR<sub>568</sub> pumpál protont. A későbbiekben - kivéve, ha külön jelezzük - minden megállapítás a bR<sub>568</sub> fotociklusára fog vonatkozni.

2. *A retinál ciklus.* A kromofór izomerizációs változásait foglalja magában, amelyek elsősorban Raman- és infravörös spektroszkópiai módszerekkel követhetők.

3. *Az opszin ciklus.* Az opszinban bekövetkező konformációs, illetve egyéb kémiai - oldalláncok protonálódása, deprotonálódása - változásokat írja le. Fő vizsgálati módszerei az UV-abszorpciós, illetve vibrációs spektroszkópia.

4. *Töltésmozgás ciklus.* A protonpumpához társult töltésmozgásokat (töltésszétválás, töltött oldalláncok, ionok elmozdulása) foglalja magában. Az alkalmazott vizsgálati módszereket később részletesebben is ismertetjük.

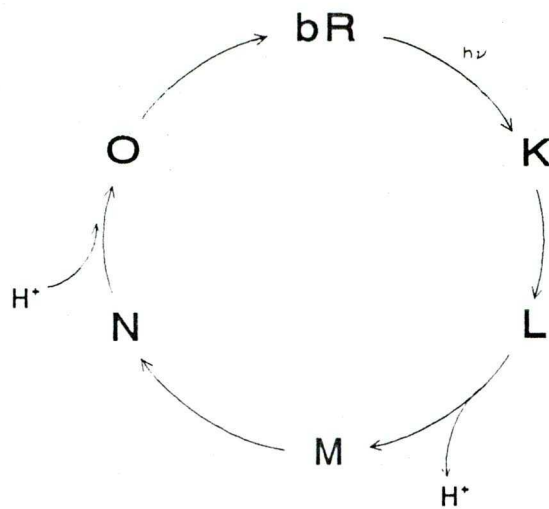
### 2.2.1 A fényabszorpciós ciklus:

A bR működésének ciklikus természetére abszorpciókinetikai mérések világítottak rá legelőször [67]. Ennek oka, hogy a  $\mu\text{s}$ -nál lassabb időállandójú abszorpcióváltozásokat meglehetősen egyszerűen, flash-fotolízis módszerrel lehet követni. A szub- $\mu\text{s}$ -os jelenségek megfigyeléséhez lézerspektroszkópai eljárásokat kell alkalmazni [71,72]. A mérés technika viszonylagos egyszerűsége ellenére sajnos még mindig nincs általánosan elfogadott fotociklus modell, aminek fő oka, hogy az alapállapot, illetve az intermedierek látható tartománybeli spektrumai meglehetősen átfednek. A fotociklus modellek tesztelésénél alkalmazható kritériumokat [68] foglalja össze.

A fotociklust a kromofór által elnyelt foton indítja, és a gerjesztés hatására  $\sim 0.5$  ps alatt egy ún.  $J_{600}$  intermedier jön létre [69,70]. Ez a fotociklus egyetlen fény által indukált folyamata, az összes ezt követő lépés termikus.

A J intermedierből  $\sim 3-5$  ps alatt alakul ki a  $K_{590}$  állapot [71,72], amelynek élettartama  $\sim 1$   $\mu\text{s}$ .

A legelső, a ciklus lassabb lépéseit leíró modellben az intermediereket ( $K_{590}$ ,  $L_{550}$ ,  $M_{412}$ ,  $N_{530}$ ,  $O_{640}$ ) egy elágazásmentes, elsőrendű és egyirányú reakciókat feltételező sémába rendezték [67,73]. Az  $N_{530}$  forma létét később megkérdőjelezték, és a fotociklus modellekből kihagyták [3]. Néhány évvel ezelőtt azonban "új" intermedierek kezdtek felbukkanni, amelyet R-nek [74], P-nek [75], illetve L'-nek [76] neveztek el. Ezekről részletesebb vizsgálatok alapján kiderült, hogy valójában minden esetben ugyanarról az intermedierről van szó, és ez lényegében a régi N formának felel meg, a korábban megállapítottól alig különböző, 550 nm-es abszorpciós maximummal [77].



5. ábra:

A bR egyszerűsített fotociklusa.

Szélesebb pH- és hőmérséklet-tartományra kiterjesztve a méréseket, az adatok értelmezéséhez szükségessé vált a [67]-ben leírt egyszerű modell módosítása [68]. Bár a spektrálisan megkülönböztethető intermedierek száma már nem nő, az újabb modellek visszareakciókat és/vagy elágazásokat is tartalmaznak. A módosítások szükségességét elsősorban az indokolta, hogy kimutatták azt, hogy mind az L, mind az M forma bomlása kétfázisú. Ez az irreverzibilis reakciókat feltételező, elágazásmentes modell alapján nem értelmezhető. A probléma egyik lehetséges megoldása lehet annak feltevése, hogy a vizsgált bR preparátum valamilyen módon heterogén és ez párhuzamosan futó, de egymástól némiképpen eltérő fotociklusokat eredményez [78,79,80,81,82]. Más szerzők szerint a multiexponenciális kinetika megmagyarázható az eredeti elágazásmentes, szekvenciális modell segítségével is, amennyiben abba megfelelő helyekre visszareakciókat építenek [83]. Legújabban optikai sokcsatornás analizátorral végzett



mérések alapján javasoltak egy olyan modellt, amelyben a szerzők szükségesnek látták két, gyakorlatilag azonos abszorpciós spektrummal rendelkező, szekvenciális M forma beillesztését, amelyeket irreverzibilis reakció kapcsol össze [84,85].

Sajnos általánosan elfogadott fotociklus modellről nem beszélhetünk. Annyi mondható biztosan, hogy az 5. ábrán látható egyszerű séma tartalmazza a leglényegesebb elemeket és legalábbis semleges pH és hőmérsékleti körülmények esetén elég jól egyezik az adatokkal. Minden újabb fotociklus modell ennek valamilyen módon kibővített változata. Meg kell jegyezni azt is, hogy a fotociklus időállandói függenek a környezet pH-jától, ionösszetételétől és ionerősségétől.

Feltételezve, hogy az átmenetek sebességi állandóinak hőmérsékletfüggése az Arrhenius törvényt követi, az egyes reakciók aktiválási entalpiája és entrópiája meghatározható [pl. 86]. Ezek kiszámításához azonban a mikroszkópikus sebességi állandók meghatározására van szükség, ami valamilyen ciklusmodell feltevése nélkül nem végezhető le. Emiatt az így kapott adatokat fenntartással kell kezelni.

### 2.2.2 A retinál ciklus:

Elsősorban rezonancia-Raman, Fourier-transzformált infravörös (FTIR) és mágneses magrezonancia (NMR) mérésekből a retinál izomerizációs állapotát, protonáltságának változásait meglehetősen jól ismerjük.

A  $bR_{568}$  állapotban a Schiff-bázis protonált, a retinál all-transz konfigurációjú és síkmolekulának tekinthető [87]. A Schiff-bázis protonja és az ellenion közötti hidrogén kötés viszonylag gyenge [87,88,89,90]. A gerjesztés hatására bekövetkező fotoizomerizáció a K állapotban egy protonált, 13-cisz, C=N-transz kromofórt eredményez [91], amely a kötőhely szerkezete által meghatározott kényszer miatt erősen csavart, torzult [92,93,94,95]. Feltehetően ezek a szterikus feszültségek relaxálnak a K → L átmenetben [96]. A retinál szerkezete az L állapotban vitatott. Léteznek ugyanis olyan proton-



pumpa modellek is, amelyek feltételezik a retinálnak egy, a  $C_{14}$ - $C_{15}$  kötés körüli elfordulással járó izomerizációját is [97]. Bár FTIR dikroizmus mérésekben azt találták, hogy a  $C_{14}$ - $C_{15}$  kötés körüli elfordulás szöge az  $L_{550}$  állapotban valamivel nagyobb mértékű, mint a  $bR_{568}$ -ban [28], az erre a szerkezetre jellemző Raman-spektrumot nem észlelték [96,98]. [98] szerint a kromofór geometriája az  $L_{550}$ ,  $M_{412}$  és  $N_{550}$  állapotokban azonos (13-cisz, C=N transz), így mindazok a proton-pumpa modellek, amelyek ebben a lépésben a  $C_{14}$ - $C_{15}$ , vagy a C=N kötések mentén végbemenő izomerizációt feltételeznek, nagy valószínűséggel kizárhatók.

Az  $L_{550} \rightarrow M_{412}$  átmenetben a Schiff-bázis deprotonálódik. Többen javasoltak olyan fotociklus modellt, amely azonos abszorpciós spektrumú, de kinetikailag eltérő M formákat tartalmaz, ezeket azonban vibrációs spektroszkópiai módszerekkel sem sikerült eddig elkülöníteni [99,100].

A Schiff-bázis reprotonációja az  $M_{412} \rightarrow N_{550}$  átmenetben következik be [101]. Bár az  $L_{550}$ ,  $N_{550}$  intermedierekben a Schiff-bázis protonált és a kromofór geometriája is azonos, a rezgési spektrumban mégis egyértelmű különbségek is észlelhetők, jelezvén, hogy ezekben az állapotokban a fehérje szerkezete eltérő [83,102].

A retinál az  $N_{550} \rightarrow O_{640}$  átmenetben reizomerizálódik [103]. A reakció sebességi állandójának pH-függéséből arra lehet következtetni, hogy a folyamat két lépésben játszódik le. Először a kromofór egy belső csoportról vesz fel proton, majd ez a belső csoport az extracelluláris térből protonálódik újra, így alakul ki az  $O_{640}$  állapot. Az  $O_{640}$  Raman-spektruma azt mutatja, hogy a kromofór térszerkezete közvetlenül az átmenetet követően torzult, még nem planáris.

A fentiek alapján a kromofór geometriája az  $L_{550}$  és  $N_{550}$  állapotok között nem változik. Valamiféle szerkezetváltozás azonban mindenképpen szükséges ahhoz, hogy a Schiff-bázis felváltva, hol az extra-, hol az intracelluláris térrel lehessen kapcsolatban. Általánosan elfogadott az a nézet, hogy a protonpumpa működéséhez a fotociklus során valamilyen jelentős fehérje-konformáció változásnak is le kell zajlania, amely a Schiff-bázist a proton leadását követően új

környezetbe helyezi át, hogy az más csoportokkal kerülhessen kölcsönhatásba (C-T modell [101]). A fotociklus során a fehérjérszben (opszin) lezajló változásokat részletesebben a következő fejezetben mutatjuk be.

### 2.2.3 Az opszin ciklus:

Az opszin szerkezetében bekövetkező változások tanulmányozására az infravörös spektroszkópia bizonyult a leginkább alkalmasnak, különösen miután irányított mutagenézissel módosított bR minták vizsgálata révén sikerült a spektrum megfelelő részeit egyes aminosav egységekhez rendelni [104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111]. Az intermedierek alacsony hőmérsékleten való befagyasztásával [112], időfeloldásos mérésekkel [113,114] az egyes formák infravörös spektrumát többé-kevésbé megállapították, bár a spektrumok származtatásának módjában, interpretálásában jelentős különbségek vannak. Az M forma fényérzékenységet felhasználva is jó minőségű L, M és N spektrumok kaphatók [111]. Az eredmények elsősorban aszparaginsav oldalláncok protonáltságának a fotociklus során bekövetkező tranziens megváltozását mutatják (Asp-85, 96 és 212) [107,110,111]. Ezek állapotát az egyes intermedierekben - [111] alapján - az 1. táblázat mutatja.

Az, hogy a  $K \rightarrow L$  átmenetben az Asp-96 valóban deprotonálódik [110, 114], vagy csak a környezete változik meg [109], kérdéses. Újabb eredmények inkább az első lehetőséget támasztják alá [111]. Az  $L \rightarrow M$  átmenetben az Asp-85 és 212 együtt protonálódnak, illetve - feltehetőleg az  $O \rightarrow bR$  reakcióban - egyszerre deprotonálódnak.

Ezeken a kizárólag a Schiff-bázis közvetlen környezetét érintő változásokon kívül az opszinban más, jelentős konformációváltozások is lezajlanak. Mint korábban említettük, elméleti megfontolások alapján szükségesnek látszik egy jelentős fehérjeszerkezet-változás feltételezése valahol az L és az N állapot között, amely biztosítaná a Schiff-bázis reprotonálódását a citoplazma felőli

## 1. táblázat:

A főbb aszparaginsav egységek és a Schiff-bázis protonáltsága az egyes intermedierekben.

+: protonált, -: deprotonált

	Asp-85	Asp-96	Asp-212	Schiff-b.
bR	-	+	-	+
L	-	-	-	+
M	+	+	+	-
N	+	-	+	+
O	+	+	+	+

oldalról [101]. Egy ilyen, az M állapotot kialakulása után létrejövő konformáció-változást valóban sikerült azonosítani [115]. A kérdés az, hogy - ha valóban létezik két szekvenciális M forma - a fotociklusban hová helyezhető ez, a két M forma közé, illetve az M → N átmenetbe. Az a tény, hogy a feltételezett két, szekvenciális M forma a jelenlegi adatok alapján sem látható abszorpció [84], sem infravörös spektrumában nem különböztethető meg, arra mutat, hogy még ha van is két soros M intermedier, ezekben mind a retinál, mind az opszin szerkezete gyakorlatilag megegyezik, a kérdéses nagy változás pedig feltehetőleg az N állapot kialakulásával megy végbe [111]. A fehérje ezt követő relaxációja pedig az N → O lépésben következik be [86]. Sajnos az O forma alacsonyhőmérsékleti infravörös spektroszkópai módszerekkel való tanulmányozása a többi intermedierhez viszonyítva nehéz, mert az O forma bomlása gyakorlatilag mindig gyorsabb, mint a kialakulása, így a fotociklus az O-nál nem "fagyasztható" be (pl. [86]).

#### 2.2.4 A töltésmozgás ciklus:

A protonfelvétel és -leadás kinetikáját optikai úton - pH érzékeny festéket használva - és vezetőképességi mérésekkel vizsgálták [116,117, 118]. Az előbbi módszerrel - a BM-okat orientáltan vezikulákba építve - megállapították, hogy a fotociklus folyamán a bR először az extracelluláris oldalra lead, majd az ellenkező oldalról felvesz egy protont. A proton leadása a külső térbe az L → M, felvétele az N → O átmenetben történik meg.

A protonpumpához társuló, molekulán belüli töltésmozgások megfigyelésére többféle módszert dolgoztak ki [119]. Mivel ezek nem annyira ismertek, mint a korábbi fejezetekben említett spektroszkópai módszerek (FTIR, Raman, NMR), illetve mert a dolgozatban bemutatandó saját eredmények jelentős része is ezen módszerek egyikének felhasználásával született, így kissé részletesebben kitérünk a különböző technikák ismertetésére.

Az elektromos jel detektálásának alapfeltétele az, hogy a minta elektromos szempontból aszimmetrikus legyen. A mérési módszerek egy részében közös az, hogy a BM-okat egy töltött felületre viszik fel (pl. bimolekuláris lipidmembrán) [120,121,122,123,124,125,126,127,128].

Tekintve, hogy a mért elektromos jelek nagymértékben függenek a modellrendszer - legtöbbször meghatározhatatlan - paramétereitől is, a proton mozgásának kvantitatív leírására a fenti módszerek csak nagyon korlátozottan adtak lehetőséget [119]. További hátrány, hogy a fenti mintákon az elektromos mérésekhez hasonló körülmények között abszorpciókinetikai méréseket végezni nem lehet.

Intézetünkben sikerült először olyan módszert kidolgozni, amely a fenti hiányosságokat nagymértékben kiküszöböli [129,130,131, 132]. Ennek lényege, hogy mivel a BM-ok jelentős permanens dipólmomentummal rendelkeznek ( $\mu_0=2 \cdot 10^{-23}$  Cm/ $\mu\text{m}^2$ ), így már viszonylag gyenge ( $\sim 20$  V/cm) elektromos térrel orientálhatók [133,134], azaz a BM

szuszpenzió elektromosan aszimmetrikussá tehető. Mivel a permanens dipólmomentum a membrán síkjára merőleges, így az orientáltság azt jelenti, hogy időben állandó, homogén elektromos térben a bR molekulák - bizonyos eloszlás szerint - egy irányba néznek [134]. A tér kikapcsolását követően az orientáció ~300-500 ms alatt szűnik meg, ami több, mint egy nagyságrenddel hosszabb, mint a fotociklus teljes időtartama [133]. Ezzel ez ún. szuszpenziós módszerrel először lehetett a fotoelektromos jelet (6. ábra) kvantitatívan is értelmezni, illetve molekuláris szintű eseményekhez kapcsolni (lásd még a 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK fejezetet).

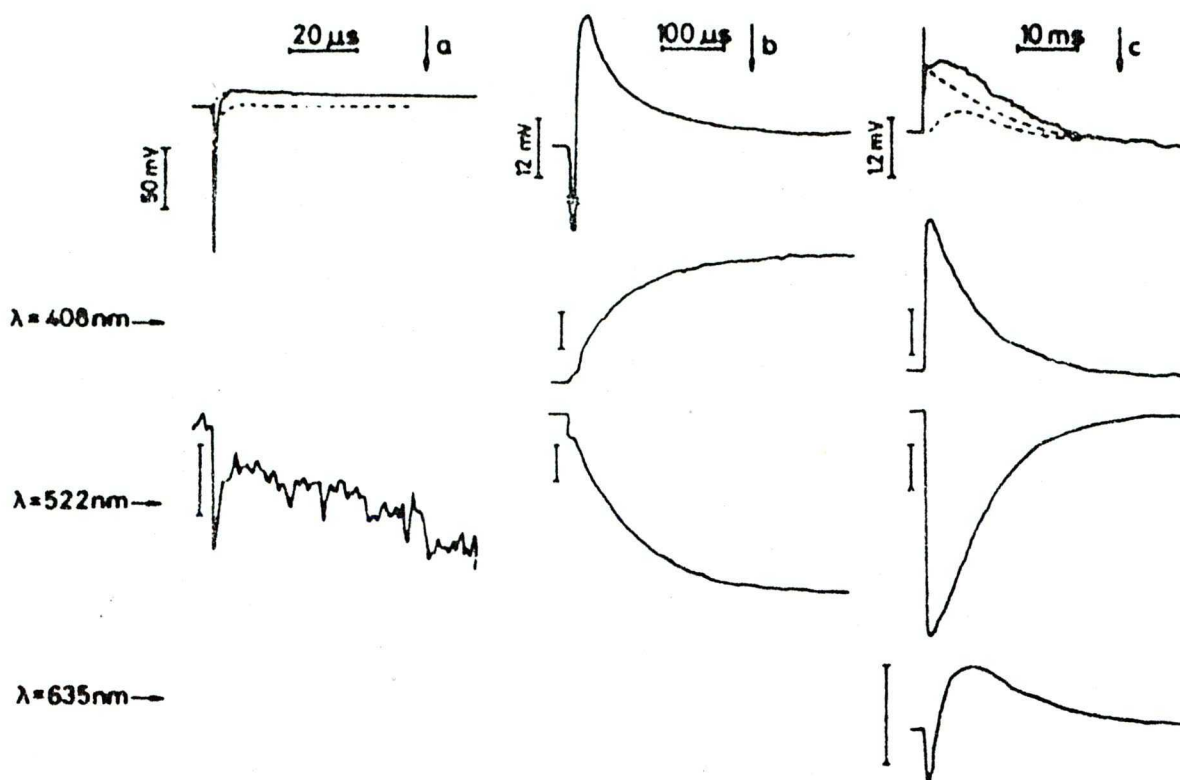
Mivel a BM-ok nettó negatív töltéssel is rendelkeznek, így elektroforézissel a pozitív síkelektrodára leülepedíthetők. A mintát kiszárítva az orientált állapot fixálható [135]. Ezek az ún. száraz minták értékes adatokat szolgáltatottak a fényabszorpciót követő igen gyors folyamatokkal [136,137], valamint a víznek a protonpumpában betöltött szerepével kapcsolatosan [138].

Mivel a szuszpenziós módszer párhuzamos optikai mérések elvégzésére is lehetőséget ad, sikerült széles pH tartományban kimutatni a fotoelektromos és abszorpciókinetikai jelek szoros korrelációját (6. ábra) [129].

A mérési eredmények kiértékeléséhez Keszthelyi Lajos és Ormos Pál dolgozták ki a fehérje elektromos válaszjelek (PERS) elméletét [129,131]. Ennek alkalmazásával az elektromos jelekből következtetni lehet arra, hogy a mozgó töltés milyen irányban, illetve milyen távolságra mozdul el a fotociklus egyes átmenetei során (2. táblázat). A PERS elmélete általános abban az értelemben, hogy mindenféle mozgó töltésre - ionra, töltött oldalláncre, dipólra - érvényes. Mivel fotoelektromos méréseink kiértékelésére az elméletet felhasználtuk, így ezt a 4. Anyagok és módszerek fejezetben röviden bemutatjuk.

A fotoelektromos jelekből számítható elmozdulásokat a fotociklusra vonatkozó akkori nézetek alapján a szerzők [131]-ben a következőképpen értelmezték:

bR → K: Iránya ellentétes a protonpumpa eredő irányával. Az ebben az átmenet-



6. ábra:

A szuszpenziós módszerrel mért fotoelektromos és abszorpciókinetikai jelek.

ben bekövetkező transz-cisz izomerizáció során a Schiff-bázison ülő proton is elmozdul. Az elektromos jelből számított távolság jó közelítésben megegyezik a Schiff-bázison ülő protonnak az izomerizációból geometriailag számítható elmozdulásával.

K → L: Ez a kicsiny, negatív elmozdulás feltehetően a K állapotban még torzult retinál további relaxációjához kapcsolódik.

L → M: Ebben az átmenetben a Schiff-bázis elveszíti protonját. Ezzel egyidejűleg az Asp-85 és 212 protonálódik (1. táblázat). A ~0.5 nm-es elmozdulás jó egyezésben van az ellenionnak és a Schiff-bázisnak a bR háromdimenziós

## 2. táblázat:

A bR fotoelektromos jeléből számított töltéselmozdulások (d) [131].

Átmenet:	bR → K	K → L	L → M	M → O	O → bR
d (nm)	-0.13	-0.02	+0.5	+3.1	+1.5

Megjegyzés: Ezek az értékek a töltésmozgásoknak csak a membrán normálisának irányába eső komponenseit adják meg.

szerkezetéből megállapítható távolságával.

A két utolsó elmozdulás lényegesen nagyobb, mint az előzőek. Feltehetően ezekben a lépésekben kerül a Schiff-bázis a külső térrel összeköttetésbe. A ~3.1 nm-es elmozdulás feltehetően a proton leadásának, az ~1.5 nm-es pedig a proton felvételének felel meg.

A bR háromdimenziós szerkezete alapján a Schiff-bázis a membrán közepe táján helyezkedik el, ami ellentmondásban van a két utolsó elmozdulásra kapott értékkel. Figyelembe kell azonban venni, hogy a PERS elméletében - jobb híján -, a fehérje belsejében a dielektromos állandót homogénnek ( $\epsilon \approx 2$ ) feltételezték. A szerkezetből azonban tudjuk, hogy a Schiff-bázist és az extracelluláris teret összekötő csatorna széles és számos vízmolekula található benne, míg a citoplazmához vezető csatorna keskeny és főként hidrofób oldalláncokat tartalmaz [21]. Ezek alapján nagyon valószínű, hogy a csatornák dielektromos állandói jelentősen különböznek. Ennek figyelembe vétele a fenti elmozdulásokat jó irányban korrigálja.

Atom  
modell  
↓  
kontinuum  
modell  
( $\epsilon$ )



Sajnos az elektromos jelek kiértékelése csak valamilyen fotociklus modell elfogadásával végezhető el, annak megválasztásától függ. Ez indokolja, hogy a [131,132]-ben leírt elemzések a fotociklus modellekből sokáig kihagyott, de 1988-ban újra "felfedezett" N formát például nem tartalmazzák. Új, a korábbi vizsgálatoknál részletesebb és a jelenlegi ismeretek alapján megtervezett PERS mérések folyamatban vannak. Ezek alapján remélhetőleg el lehet majd választani az  $M \rightarrow N$ , illetve  $O \rightarrow bR$  átmenetekhez tartozó komponenseket is.

### 2.3 A PROTON-TRANSZLOKÁCIÓ MECHANIZMUSA:

A bR protonpumpa működésének molekuláris mechanizmusa még távolról sem tekinthető tisztázottnak. Ebben a fejezetben az eddigi ismeretek összegzése-képpen alkotott, viszonylag széles körben támogatott modellt fogjuk vázolni, főként [6] alapján.

Az energiaátalakítás lényege, hogy a fotociklus során a gerjesztő fény energiájának egy része (~60%-a) protonok vektoriális, aktív transzportját hozza létre, amely proton elektrokémiai potenciált eredményez.

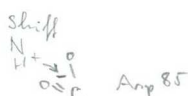
A fotociklus legelső lépéseként a gerjesztő foton energiája a fényindukált transz-cisz izomerizáció (bR  $\rightarrow$  K átmenet) során zömében elektrosztatikus energiává alakul, mivel az izomerizáció révén a protonált Schiff-bázis eltávolodik negatív töltésű ellenionjától, és feltehetően új, kisebb dielektromos állandójú környezetbe kerül. A fotoelektromos jelek azt is mutatják, hogy ez a töltésmozdulás a protonpumpa eredő irányával ellentétes.

Az L  $\rightarrow$  M átmenetben a Schiff-bázis protonja az Asp-85-re kerül át. Az Asp-85 protonálódása a közeli Arg-82 deprotonálódását indukálja, és ez a proton lép ki aztán a külső térbe. A Schiff-bázis az elvesztett protont az Asp-96-ról pótolja az M  $\rightarrow$  N átmenetben. Ezt a folyamatot az is elősegíti, hogy a Schiff-bázis és környezete a proton leadása miatt negatívvá vált. Az Asp-96 feltehetően az N  $\rightarrow$  O átmenetben reprotonálódik. Ugyanekkor a korábban bekövetkezett

Hogyan határozzuk meg ezt a határfelületet?

szja makroelektronika!  $\epsilon!$

Mi történik a K  $\rightarrow$  L átmenetben?



el. st.  
 fiziol.  
 hatás?



Mekkora a protonálható csoportok közti távolságok?  
 Néhány lépéssel a teljes membrán átérhető?  
 (A hidrogénhidak távolsága  $< 2-3 \text{ \AA}$ )

23

"Bucket-brigade" modell vagy elektrosztatikus költés. hatás okozza a proton-transzlokációt? Tied akkor Asp csökkenést okozni az Arg 82-nél, hogy neutrális pH-n deprotonálódjon?

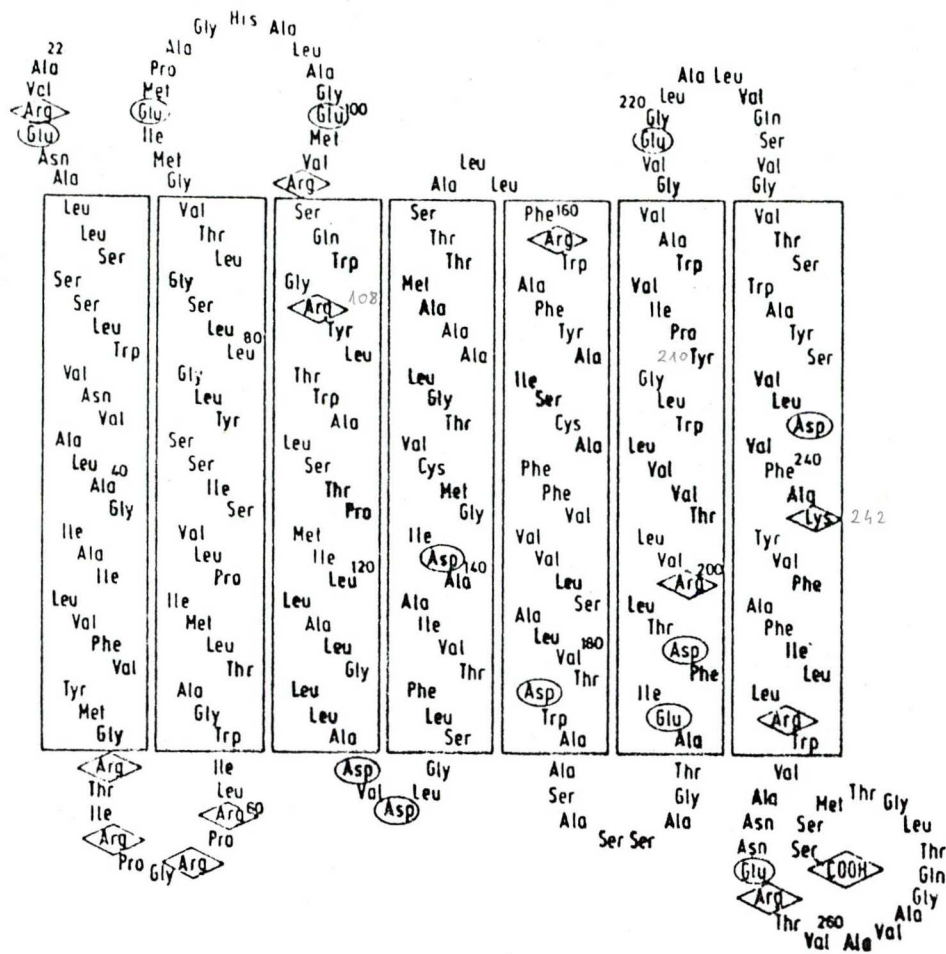
fehérjeszerkezet-változás is relaxál, ami maga után vonja a kromofór reizomerizációját is. Az O forma 640 nm-es abszorpciós maximumát az magyarázza, hogy az Asp-85 még protonált. Ez - a kiindulási helyzethez képest - a pozitív töltések többletét jelenti, mivel a Schiff-bázis már visszavette protonját. Az elektrosztatikus taszítás kényszerítheti az Asp-85-öt arra, hogy protonját az O → bR átmenetben az Arg-82-nek átadja és ily módon záruljon a fotociklus. Ez a mechanizmus - implicate - két M formát feltételez. Ugyanis az M forma megjelenik, amint a Schiff-bázis protonja az Asp-85-nek leadódik, és ezt követően valamilyen - valószínűleg fehérjeszerkezet - változásnak biztosítania kell, hogy a Schiff-bázis az ellenkező oldalon lévő csatornával kerülhessen kapcsolatba és így az Asp-96-ról protont vehessen fel. Meg kell még említeni, hogy a fenti mechanizmus alapján - az M formához hasonlóan - szintén két N formát feltételezünk, hiszen az N → O átmenetben is két folyamat - az Asp-96 reprotonálódása, illetve a kromofór reizomerizációja - zajlik le.

### 3. A HALORODOPSZIN: Összehasonlítás a bakteriorodopszinnal

A halorodopszin (hR) egy - szintén a *Halobacterium halobium*-ban található - ~27000 D molekulatömegű retinálfehérje, amely fény hatására Cl<sup>-</sup> ionokat pumpál a sejtmembránon keresztül az extracelluláris térből a sejt belsejébe. A hR a Cl<sup>-</sup> ionok mellett képes más halid ionok, Br<sup>-</sup> és I<sup>-</sup> transzportjára is [14,139,140]. A hR a sejtmembránban nem tömörül a BM-hoz hasonló kristályos szerkezetbe, ami izolálását, térszerkezetének meghatározását, illetve fotoelektromos tulajdonságainak vizsgálatát nagymértékben nehezíti.

Milyen mennyiségben (arányban) fordul elő a hR?

A hR aminosav szekvenciája a 7. ábrán látható [141]. Spektroszkópiai mérések, illetve a szekvencia analízise arra mutatnak, hogy a hR is hét α-hélixből áll, amelyek a membránt átszelik. A hélixek itt is egy hidrofil csatornát fognak körül, amelyet a retinál zár le. A molekula transzmembrán része a bR-nal 36%-os homológiát mutat, és az azonos aminosavak többsége a csatorna közelébe esik.



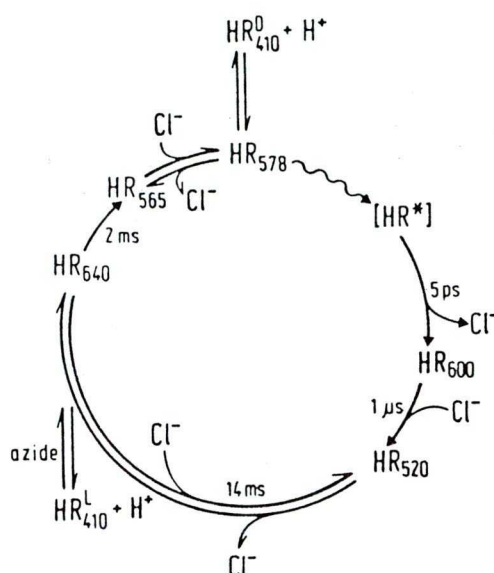
7. ábra:

A hR aminosav szekvenciája és másodlagos szerkezetének modellje.

A ellipszisek a pozitívan, a rombuszok a negatívan töltött csoportokat jelzik.

A szekvenciában csak egyetlen lizin található (Lys-242), amelyhez a retinál egy protonált Schiff-bázison (C=N) keresztül kovalensen kötődik. A működés szempontjából lényegesek lehetnek a töltött oldalláncokkal rendelkező, a fehérje transzmembrán részében található aminosavak: az Asp-141, 238, Tyr-210, Arg-108 és 200. Mivel az Asp-238 és a Tyr-210 (esetleg az Asp-141 is) a Schiff-bázis közelében helyezkednek el, ezért valószínűleg ezek a Schiff-bázis ellenionjai. A megőrződött aminosavak között vannak azon triptofánok megfelelői is, amelyek a bR-ban a retinált rögzítik (Trp-106, 112, 207, 214). A hR molekulának

két különböző ionspecifitású anion kötőhelye van [142,143]. Ezekről kimutatták, hogy az anionokhoz való affinitásuk a fotociklus során változik. Igen valószínű, hogy az anion-kötőhelyeket az Arg-108 és 200 alkotják, mivel mindkettő a retinál közelében helyezkedik el, és így az ionkötődés által okozott töltésváltozást a Schiff-bázis érzékelheti [143]. A másik kilenc arginin a fehérje felületén található, kémiai módosításuk a fotociklust és a transzport-tulajdonságokat jelentősen nem befolyásolja.



8. ábra:

**A halorodopszin fotociklusa.**

A halorodopszin látható színeképtartománybeli abszorpciós spektruma a bakteriorodopszinéhoz hasonló [139]. A spektrum maximuma nagy Cl<sup>-</sup> (vagy Br<sup>-</sup>, illetve I<sup>-</sup>) koncentráció (~1 M) esetén 578, kis Cl<sup>-</sup> koncentrációnál pedig 565 nm-nél található. A hR működése a fenti anionok jelenlétében azonos, ezek kicserélésével csak az egyes reakciók sebességállandói módosulnak [144]. Megvilágítás hatására a hR - a bR-hez hasonlóan - fotocikluson megy át, amelynek egyszeri körülfordulási ideje ~15 ms [145,146]. A fotociklus sémája a 8. ábrán látható [145].

A  $hR_{640}$  forma a  $hR_{520}$ -szal Cl<sup>-</sup> koncentráció függő egyensúlyban van, az egyensúlyi állandó ~100mM. Hasonló folyamat játszódik le a  $hR_{565} \rightarrow hR_{578}$  átme-

netben is (egyensúlyi állandó  $\sim 10\text{mM}$ ). A bR-nal ellentétben a hR fotociklusában nincsen M-szerű forma (a Schiff-bázis nem deprotonálódik). Folyamatos megvilágítás hatására azonban - egy igen lassú oldalreakció eredményeképpen - megjelenik egy  $\text{hR}_{410}$  forma, amelynek kialakulási sebessége pH függő (csökkenő pH-val csökken).

A hR transzportaktivitását bimolekuláris lipidmembrán és vezikula rendszereken stacionárus áram mérésével vizsgálták [147]. Ezek során megállapították, hogy  $\text{Cl}^-$  ionok hiányában töltéstranszport nem történik. A hR fotoelektromos aktivitását a bR-ra már kidolgozott módszerek felhasználásával intézetünkben is vizsgáltuk [148,149]. Orientáltan gélbe ágyazott mintán végzett méréseink a halorodopszin esetén is az optikai és elektromos jelek szoros korrelációját mutatták, ami jelzi, hogy a halorodopszin működésében - a bR-hoz hasonlóan - a retinálnak meghatározó szerepe van. Az elektromos jelet exponenciális függvények összegével illesztve négy komponens volt elkülöníthető, amelyeknek időállandói:  $< 0.5\mu\text{s}$ ;  $2\mu\text{s}$ ;  $0.5\text{ms}$ ;  $4\text{ms}$ . A PERS elmélet alapján az illesztést követően az egyes komponensekhez rendelhető  $A_i \cdot \tau_i$  (amplitúdó · időállandó) mennyiség arányos a mozgó töltés és az elmozdulás nagyságával. Az első három komponensre ez a mennyiség  $\text{Cl}^-$  koncentrációtól függetlennek bizonyult, míg a leglassabb esetén csökkenő  $\text{Cl}^-$  koncentrációval csökkent,  $\text{Cl}^-$  ionok hiányában pedig nullának adódott. Az első, fel nem oldott komponens feltehetőleg a retinál fényindukált izomerizációját kísérő töltésszeparációt, míg a második két, ellentétes előjelű komponens az így kialakult dipól relaxációját tükrözi. Ezzel szemben -  $\text{Cl}^-$  koncentráció függését figyelembe véve - az utolsó, leglassabb komponens valószínűleg a  $\text{Cl}^-$  transzporthoz kapcsolódik.

A hR működésének molekuláris mechanizmusára vonatkozóan a bR-nál jóval kevesebb információ áll rendelkezésre. Egy igen egyszerű modell felvázolására a fent említett fotoelektromos, illetve a dolgozat tárgyát képező egyéb méréseink alapján a 7. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE című fejezetben teszünk kísérletet.

#### 4. CÉLKITŰZÉS:

A bR és hR szekvenciákat összehasonlítva megmagyarázható, hogy a hR miért nem képes protonok aktív transzportjára. Hiányoznak ugyanis belőle a bR-beli Asp-85-nek, illetve Asp-96-nak megfelelő egységek, amelyekről ismert, hogy a bR protonpumpa szempontjából kulcsfontosságúak [14].

Nehezebb azonban arra érveket találni, vajon miért nem képes a bR aniontranszportra. Ugyanis az a két arginin egység, amely a hR-ban anion-kötőhelyként funkcionál, a bR-ben is megtalálható.

Magyarázatként a következő lehetőségek képzelhetők el:

a, A bR-ben az argininek töltése negatív csoportok közelsége miatt leárnyékolódik.

b, Valamilyen környezeti tényező hatására az oldalláncok pK-ja lecsökken, azaz fiziológiás körülmények között nem protonáltak.

c, Lehetséges továbbá az is, hogy a bR térszerkezete miatt ezek a kötőhelyek egyszerűen nem hozzáférhetőek az anionok számára.

Az első két lehetőség kapcsán merült fel az a gondolat, hogy meg kellene vizsgálni a bR transzportaktivitását olyan alacsony pH-n, ahol mind a karboxil, mind az arginin oldalláncok csaknem biztosan protonáltak.

*De miért kell ilyen alacsony pH-t beállítani? (pH=0.5)*

Dér András és munkatársai végezték az első kísérleteket és megállapították, hogy pH=0.55-ön fényindukált töltéstranszport jön létre, ha a pH-t sósavval állítják be [151]. Ezzel szemben sósav helyett kénsavat használva pumpaaktivitást nem tapasztaltak. Az eredmények értelmezése során vetették fel azt a lehetőséget, hogy a bR igen alacsony pH-n esetleg anionokat pumpál. A dolgozatban bemutatásra kerülő kísérletekben ezt a kérdéskört akartuk alaposabban körüljárni és további érveket találni az aniontranszport mellett. A mérési eredmények értelmezése kapcsán megadunk egy vázlatos modellt arra vonatkozóan, hogy milyen mechanizmus teheti képessé a bR-t arra, hogy környezetének pH-jától függően vagy protonokat, vagy anionokat pumpáljon.



## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK:

### 5.1. MINTAKÉSZÍTÉS:

A mérésekben használt BM fragmentumok a *Halobacterium halobium* JW-3 (ET 1001)-es törzsből, a szokásos eljárással készültek [150]. A BM-okat valamennyi méréshez - [132] szerint - poliakrolamid gélbe ágyasztuk, úgy hogy a membránokat a polimerizáció alatt a szuszpenzióra kapcsolt 15 V/cm-es elektromos térrel orientáltuk. A gél megszilárdulása után (~1 perc) a gélt kb. 12 óráig ionmentes vízben áztattuk, illetve a különböző méréseket megelőzően legalább ugyanennyi ideig inkubáltuk a megfelelő oldatban.

A gélmódszer előnye, hogy az orientáció az arra legmegfelelőbb körülmények között - kis ionerősség, semleges pH - végezhető. A környezeti paraméterek ezután széles pH- és ionerősség-tartományban variálhatók anélkül, hogy a minta aggregálna, illetve az orientáció foka megváltozna. A gél optikailag igen tiszta, abszorpciója a látható tartományban elhanyagolható. Mivel ugyanaz a minta nagyon sok mérésre felhasználható, kvantitatív összehasonlító vizsgálatokban ez a módszer egyedülállónak bizonyult. A szuszpenziós módszerrel való összevetés alapján állítható az, hogy a gél a bR működését nem befolyásolja [132].

helyesítés!

### 5.2 A MÉRŐESZKÖZÖK LEÍRÁSA:

#### Az abszorpciós spektrumok mérése:

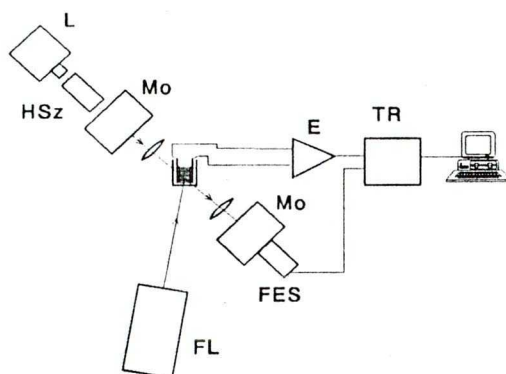
Az abszorpciós spektrumokat Perkin-Elmer Lambda-4 típusú, kétsugaras spektrométerrel mértük. A titrálásos mérések során a pH-t OP-0808 kombinált elektródával mértük, amelyet - a mérési tartománytól függően - pH=0, 2, 4 és 7 standardokkal kalibráltunk. A  $p^2H$  értékeket a pH elektródával mért értékből 0.41-et kivonva határoztuk meg.

← inodalou!

$pD = \text{apparent pH} + 0.40$   
Mitschelson and Nielsen (1960)  
Glasoe and Long, (1960)  
J. Phys. Chem.

### Tranziens abszorpciós és fotoelektromos jelek mérése:

Az orientált membrándarabkákat tartalmazó gélből 10·5·2 mm-es darabkákat vágunk, amelyeket egy 1.5 cm széles, 2 mm vastag küvettába helyeztünk. A küvettát 5 mm magasságig töltöttük fel a megfelelő inkubáló oldattal. Az elektromos jeleket az oldatba bemerülő, platinakorommal bevont platina elektródákkal vezettük el. Elektromágneses árnyékolás céljából a küvettát egy réztömbben helyeztük el, amelynek szemközti oldalain egy-egy 3 mm átmérőjű kör alakú nyílást vágunk megvilágítás céljából. A fotoelektromos és abszorpciós kinetikai mérésekhez használt mérőberendezés sémája a 9. ábrán látható.



### **9. ábra:**

**Az abszorpciós kinetikai és fotoelektromos méréseknél használt mérőberendezés vázlatja.**

Rövidítések és a műszerek specifikációja:

L: 250 W halogén lámpa; HSz: hőszűrő (víz); Mo: monokromátor; FES: fotoelektron-sokszorozó, E: erősítő (háziilag készített); TR: Thurlby DSA-524 tranziens rekorder (8 bit feloldás, analóg sávszélesség 35 MHz); FL: háziilag épített, excimer lézerrel pumpált festéklézer (energia ~ 5 mJ/impulzus, impulzushossz 15 ns,  $\lambda_{\max} = 590$  nm). Az egyes jeleket a tranziens rekorderből számítógépbe átolvastuk, és ott átlagoltuk.

### Stacionárius fotoáramok mérése:

A folyamatos megvilágítás hatására létrejövő fotoáram jelek mérésénél a 9. ábrán látható elrendezésben szereplő monokromátor helyett egy szélessávú



üvegszűrőt alkalmaztunk (abszorpciós maximum=550 nm, átteresztési tartomány ~150 nm). A halogénlámpa fényét mechanikus úton kapuztuk.

Az eredményeket minden esetben számítógépbe olvastuk, szükség esetén átlagoltuk és saját fejlesztésű programokkal értékeltük ki.

### 5.3 A TRANZIENS FOTOELEKTROMOS JELEK KIÉRTÉKELÉSE:

A fehérje-elektromos válaszjelek (PERS) elméletét Keszthelyi Lajos és Ormos Pál dolgozták ki [129]. Bár ez eredetileg a szuszpenziós módszerhez készült, az elektromos helyettesítő körök egyezése miatt (10. ábra) változtatás nélkül alkalmazható gélbe ágyazott minták esetén is.

Gondolatmenetük a következő volt. Szemeljük ki a szuszpenzióban egy BM-t és tegyük fel, hogy ennek mindkét oldalát síkelektrodák határolják, valamint tekintsük a membránt homogén szigetelőnek. Tegyük fel továbbá, hogy a bR nagyon rövid időtartamú gerjesztését követően intramolekuláris töltésmozgás játszódik le. Az elektrodinamika Ramo-Shockley tételének értelmében a külső körben:

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

*Q = ?  
elemi töltés?*

eltolódási áramlökés keletkezik. Ahol  $D'$  az elektródák távolságát,  $v(t)$  a mozgó töltés sebességét,  $\epsilon$  pedig a BM-ok dielektromos állandóját jelenti. A töltés mozgását az egyes átmenetekben nagyon gyorsnak képzeljük, azaz mintegy átugrik egyik helyről a másikra. Az (1) egyenletet idő szerint integrálva megkaphatjuk 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 töltésugrás távolsága. Mivel egyszerre nagyszámú bR molekulát gerjesztünk, így az egész mintára való kiterjesztéshez figyelembe kell venni a töltésugrások időbeli eloszlását is. Ez a folyamat - elsőrendű reakciókat és

független töltésugrásokat feltételezve - leírható a rádióaktív bomlások elméletében használatos Buteman-függvényekkel, amelynek alakja az  $i$ -edik átmenetre:

$$f(k_1, k_2, \dots, k_i, t) = k_1 \cdot k_2 \cdot \dots \cdot k_{i-1} \sum_{v=1}^i \frac{e^{-k_v t}}{a_{iv}}, \quad (3)$$

ahol  $a_{iv} = \prod_{\substack{j=1 \\ j \neq v}}^i (k_i - k_j)$

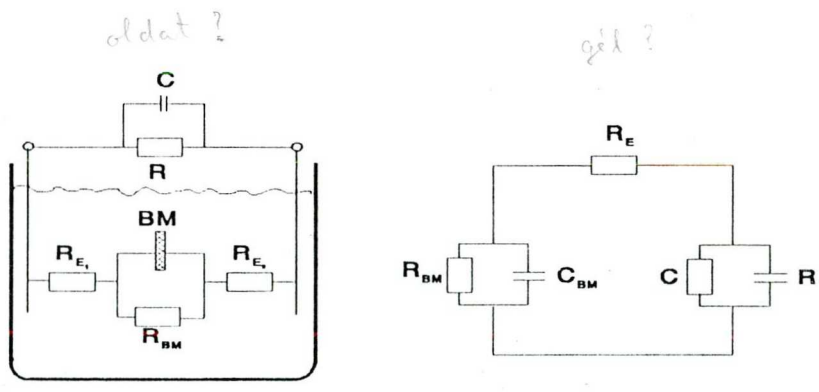
és  $k_i$  az  $i$ -edik átmenet sebességi állandója.

Feltéve, hogy  $k_i \ll 1/R'C$  és  $k_i \ll 1/R_{BM}C_{BM}$ , a külső körben mérhető áramlökés a következő formába írható:

$$I_i(t) = \frac{NQ_i d_i}{\epsilon D'} F_i k_i f_i(k_1, k_2, \dots, k_i, t) \quad (4)$$

*Mekkora a kapacitás?  
Ugy tudom, hogy  $\mu F$  nagyságú is lehet (v. ö. Maximetti)*

Itt  $N$  a fotociklusban résztvevő molekulák száma,  $F_i$  pedig egy korrekciós faktor, amely az orientáció fokát, valamint az  $R_{pm}/R_E \propto D'/D$  arányt veszi figyelembe. Mivel  $F_i$  értéke nem adható meg egzakt módon, így a (4) egyenlet alapján kiszámítható relatív értékeket a membrán vastagságára normálni kell.



*Ezre lehet történetik hivatkozán?*

**10. ábra:**

A minta helyettesítő köre egy membránfragmentumra (BM) vonatkoztatva.

Az  $R_{E1}$ ,  $R_{E2}$  és  $R_{BM}$  a két elektróda között - az ábra szerint - az elektrolithoz rendelt ellenállások,  $C_{BM}$  a bíormembrán kapacitása,  $R$  illetve  $C$  pedig a mérőkör ellenállása, illetve kapacitása. A levezetésben szerepelnek még:  $R_E = R_{E1} + R_{E2} + R_{BM}$ ;  $R' = R \cdot R_E / (R + R_E)$ ;  $D'$  pedig a bíormembrán vastagsága.

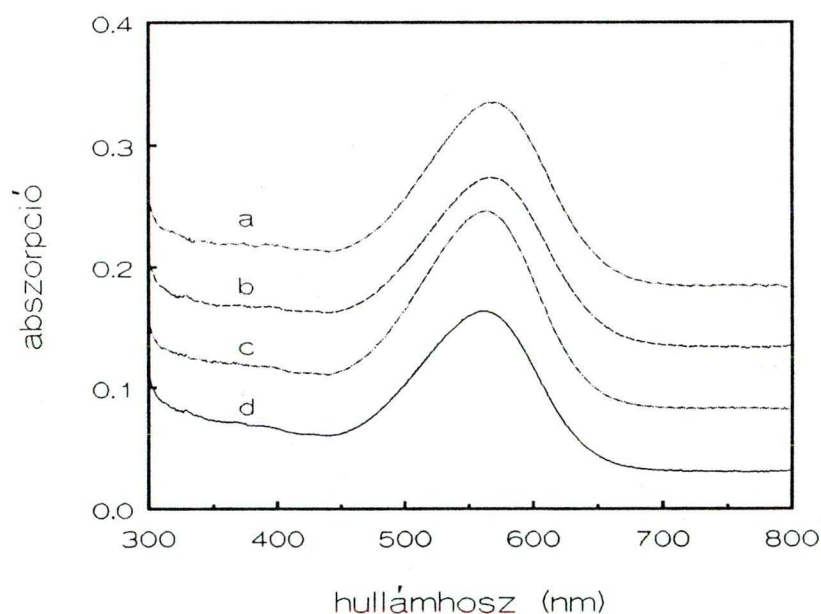
Az  $I_i(t)$  áramlökések összegéből (amely lényegében a mért görbe alatti területtel egyezik meg) megállapítható, hogy volt-e töltéstranszport. Ugyanis, ha az elektromos jelek a fehérje töltött részeinek mozgásából származnának a teljes területnek zérusnak kellene adódnia, mivel a fotociklus végén a fehérje a kiindulási állapotba tér vissza. Megfordítva, a nullától különböző terület töltéstranszportra utal.

## 6. EREDMÉNYEK:

Abból a célból, hogy az alacsony pH-n feltételezett anion transzporttal kapcsolatosan további információkat szerezzünk, elsősorban azt vizsgáltuk, hogy a transzportált ion tömegét változtatva (nevezetesen a protonokat deutériumra, a  $\text{Cl}^-$  ionokat  $\text{Br}^-$  ionokra cserélve) a transzportfolyamat milyen lépései módosulnak a különböző körülmények között (alacsony, illetve semleges pH).

*csak most  
beszédnek  
az eredmények!*

### 6.1 AZ ABSZORPCIÓS SPEKTRUM PH, ILLETVE IONFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA:



11. ábra:

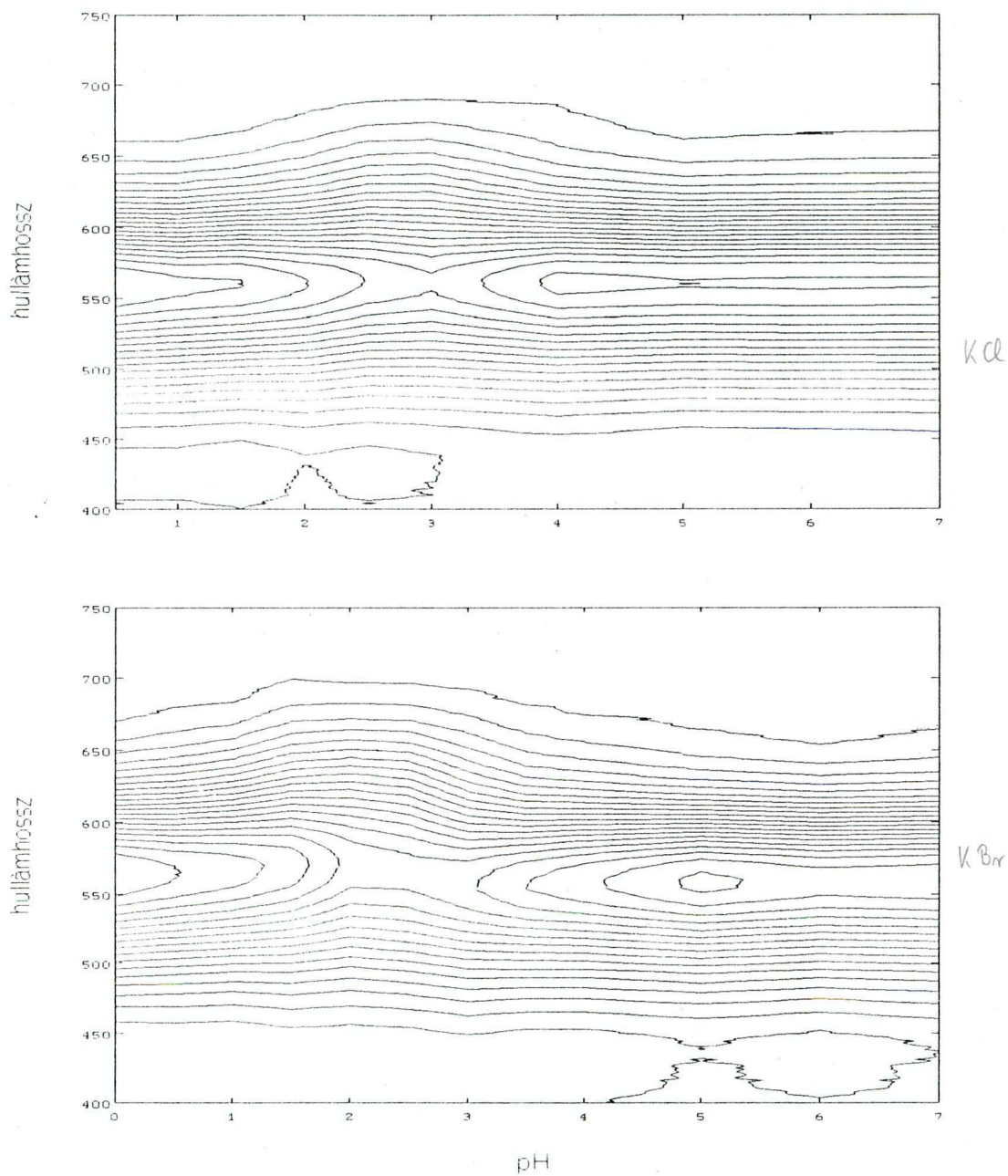
A  $\text{Br}^-$  abszorpciós spektruma különböző közegekben.

a, 4 M KBr vízben ; b, 4 M KBr  $^2\text{H}_2\text{O}$ -ben ; c, 4 M KCl vízben ; d, 4 M KCl  $^2\text{H}_2\text{O}$ -ben oldva ; pH=0.0.

Az spektrumok alapvonala a jobb áttekinthetőség miatt el van csúsztatva.

Közel semleges pH-n a bR abszorpciós spektruma sem  $\text{H}_2\text{O}-^2\text{H}_2\text{O}$ , sem  $\text{Br}^-$ - $\text{Cl}^-$  csere esetén nem változik jelentősen. A 11. ábrán a bR abszorpciós spektruma látható pH=0.0-n 4 M KCl, illetve 4 M NaCl jelenlétében, ahol a savas bíbor formába való átmenet gyakorlatilag végbement (lásd 12. ábrát is). Az abszorpciós maximum  $\text{Cl}^-$  jelenlétében 564 nm-nél,  $\text{Br}^-$  jelenlétében pedig 568 nm-nél található, a proton - deutérium csere a maximum helyét gyakorlatilag nem változtatta.

Az abszorpciós spektrum pH függését is megvizsgáltuk - szintén 4 M KCl, illetve 4 M NaCl esetén -, hogy lássuk a fenti mérésekben mennyiben sikerült kizárólag savas-bíbor formát előállítani. A 12. ábra szintvonalas ábrázolásban (az egyes spektrumok azonos abszorpciójú helyei vannak összekötve) mutatja a pH=0 és 7 között 0.5 pH egységenként felvett abszorpciós spektrumokat. Mint már az irodalmi áttekintésben említettük, ebben a pH tartományban három bR forma jelenik meg: a  $\text{bR}_{568}$  (normál),  $\text{bR}_{605}$  (savas-kék) és a  $\text{bR}_{564}$  (savas-bíbor). Az ábrán látható, hogy ilyen nagy sókoncentráció esetén (4 M) tiszta savas-kék állapot semmilyen pH-n nem állítható elő, mivel megjelenése az abszorpciós maximum 605 nm-re tolódása helyett csak egy vállat eredményez a  $1 < \text{pH} < 5$  tartományban. Ezt  $\text{pH} \approx 2.5-3$  körül a szintvonalak vörös felé tolódása, illetve a  $\sim 565$  nm hullámhossznál megjelenő völgy jelzi a ábrán. A szintvonalak párhuzamossága a spektrum változatlanságát mutatja. Jól látható, hogy míg KCl-ban  $\text{pH}=1$  alatt a savas-kék forma által okozott kiszélesedés már gyakorlatilag megszűnik, addig KBr-ban ez még  $\text{pH}=0$  körül sem mondható el. Valószínűnek tűnik, hogy a 11. ábrán a KCl-ban, illetve KBr-ban mért savas-bíbor spektrumok maximuma közötti kismértékű eltérés (564, illetve 568 nm) ezzel magyarázható. Összegezve: a két anion jelenlétében mért abszorpciós spektrumok és a pH titrálási görbék hasonlósága arra mutat, hogy a két ion kötődése azonos mechanizmus szerint történik, de  $\text{Br}^-$  ionok jelenlétében a savas-kék - savas-bíbor átmenet  $\text{pK}$ -ja alacsonyabb.



**12. ábra:**

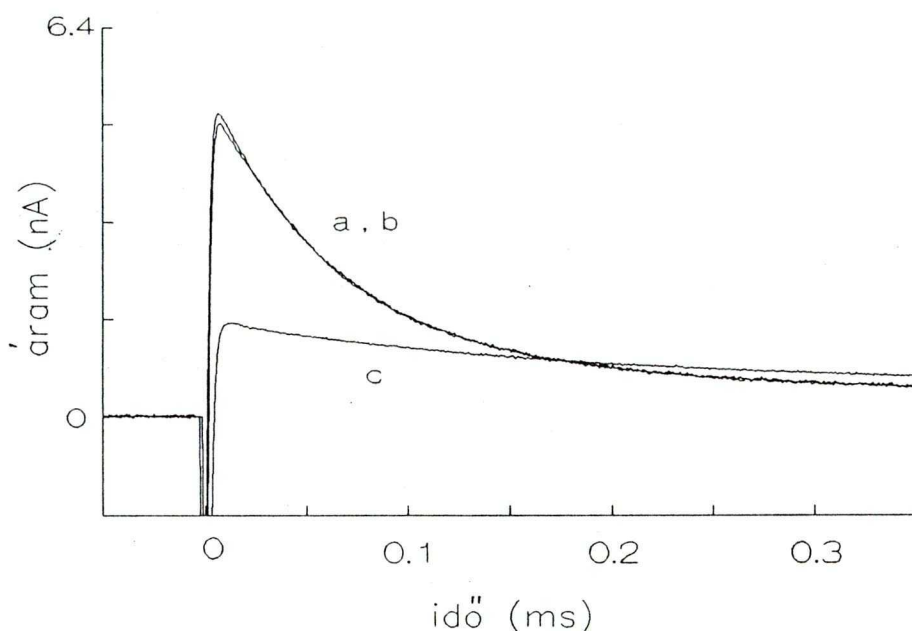
**A bR abszorpciós spektrumának változása a pH függvényében  
(szintvonalas ábrázolás).**

(felül: 4 M KCl-ban; alul: 4 M KBr-ban. A pH-t tömény kénsavval állítottuk.)

## 6.2 AZ ELEKTROMOS JELEK PH, ILLETVE IONFÜGGÉSE:

### Mérések semleges pH-n:

Az 13. ábrán láthatók a semleges pH-n mért tranziens fotoáram-jelek  $\text{H}_2\text{O}$ -ban, illetve  $^2\text{H}_2\text{O}$ -ban oldott  $\text{Cl}^-$  vagy  $\text{Br}^-$  ionok jelenlétében.



13. ábra:

**Semleges pH-n különböző oldatokban mért tranziens elektromos jelek.**

Az inkubáló oldatok: a, 300 mM NaCl  $\text{H}_2\text{O}$ -ban; b, 300 mM NaBr  $^2\text{H}_2\text{O}$ -ban; c, 300 mM NaCl  $^2\text{H}_2\text{O}$ -ban oldva (pH=6.9). Az ábrázolt görbék időfeloldása 40  $\mu\text{s}$ /csatorna.

A fotoelektromos jelek exponenciális függvények összegével való illesztéséből a 3. táblázatban látható időállandók származtathatók.

Ezeket összehasonlítva jól látható, hogy ezen a pH-n az anioncsere lényeges hatást nem eredményezett. Ezzel szemben a korábbi abszorpciókinetikai, illetve elektromos mérésekkel egyezésben a  $\text{H}_2\text{O}$   $^2\text{H}_2\text{O}$ -ra való kicserélése az



### 3. táblázat:

A 11. ábrán látható fotoáramok kinetikai analízisének eredménye.

*Er nincs az ábrán*

Időállandó:	NaCl (H <sub>2</sub> O)	NaCl (²H <sub>2</sub> O)	NaBr (H <sub>2</sub> O) <sup>²H<sub>2</sub>O?</sup>
$\tau_1$	$(5.71 \pm 4.7) \cdot 10^{-5}$ (38.2)	$(2.0 \pm 1.0) \cdot 10^{-4}$ (29.4)	$(6.1 \pm 5.1) \cdot 10^{-5}$ (56.9)
$\tau_2$	$(2.8 \pm 1.8) \cdot 10^{-4}$ (44.5)	$(9.9 \pm 3.0) \cdot 10^{-4}$ (111)	$(3.2 \pm 1.4) \cdot 10^{-4}$ (34.3)
$\tau_3$	$(5.4 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ (273)	$(7.9 \pm 0.6) \cdot 10^{-3}$ (620)	$(5.4 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ (299)

A táblázatban szereplő adatokat a tranziens fotoáram jelek integráljának exponenciális függvények összegével való illesztésével kaptuk. Az integrálást az indokolja, hogy ilymódon a lassabb, kisebb amplitúdójú komponensek, amelyekhez azonban nagy töltésmozdulás társul, az illesztés szempontjából kedvezőbben súlyozódnak. Az időállandók másodpercben, a zárójelben szereplő amplitúdók pedig önkényes egységben adóttak. A leggyorsabb negatív komponensre vonatkozó adat nem szerepel, mivel ennek időállandóját a mérőrendszer határozta meg.

*v.ö. a (h) egyenlettel!*

*? Nem értem a komponensek amplitúdóit*

*$\tau_3$  mikor nem is látható a kinetikában, pedig nagy az amplitúdója.*

iontranszportot tükröző mikroszekundumos, illetve milliszekundumos folyamatokban jelentős lassulást váltott ki. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a - természetesen jól ismert - ténnyel, hogy a bR semleges pH-n protonpumpaként működik és az átlagos átviteli sebességet az iontömeg befolyásolja.

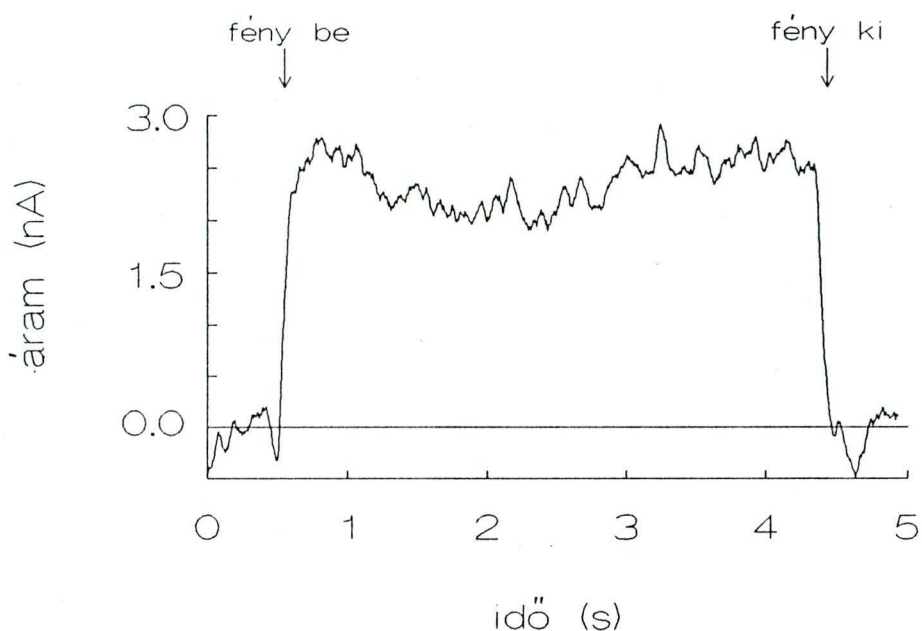
*Milyen mértékben a lassulás a H $\rightarrow$ D csereivel?*

#### Mérések alacsony pH-n:

Dér és munkatársai kimutatták [151], hogy a bR lézerpulzussal való gerjesztésre adott elektromos válaszjele pH=0.55-ön különböző, ha a pH-t sósavval, illetve kénsavval állítjuk be. A mért tranziens fotoáram jelek alatti területösszeg a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-os mintában nullának adódott, amelyből az valószínűsíthető, hogy iontranszport gyakorlatilag nincs. Mivel kénsavban ezen a pH-n csak bR<sub>605</sub>



található, megállapíthatjuk tehát, hogy a savas-kék forma nem pumpál ionokat. Ezzel szemben  $\text{Cl}^-$  ionok jelenlétében ugyanez a mennyiség nullától különbözőnek adódott, ami azt mutatja, hogy valamilyen ion - nagy valószínűséggel  $\text{Cl}^-$  - transzportálódik.

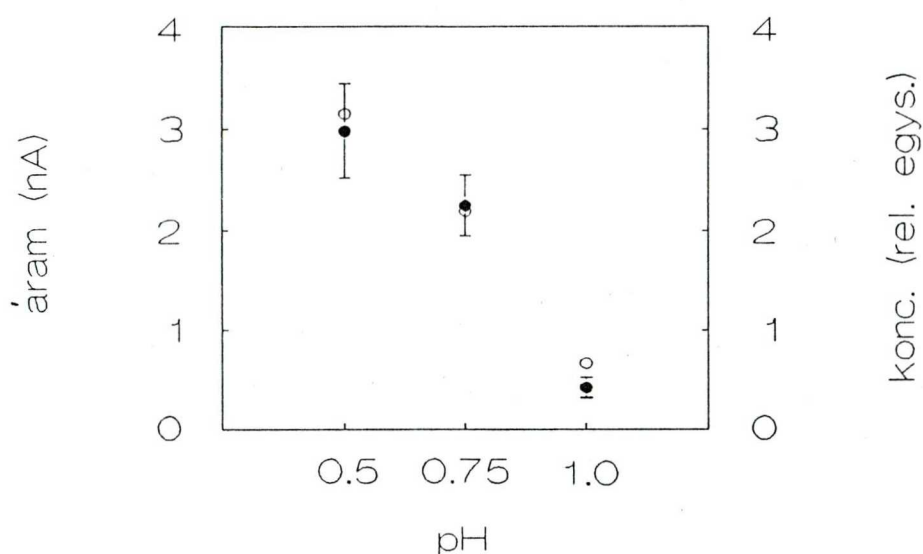


14. ábra:

**Folyamatos fénnel létrehozott fotoáram, pH=0.5 HCl-val beállítva.**

Ezt a következtetést kvázi-folytonos áram mérésével is megerősítették, ahol a mintát 16, egymást 50 Hz-es frekvenciával követő egyes impulzusból álló sorozattal gerjesztették. Fotoáramot ekkor is csak a  $\text{Cl}^-$ -os minta esetén észleltek.

Ezen eredmények kiterjesztése, illetve megerősítéseképpen végeztünk további kísérleteket. A 14. ábra mutatja a folytonos fénnel 4 s-ig megvilágított mintán regisztrált áramot, ahol a pH-t HCl-val 0.5-re állítottuk be.

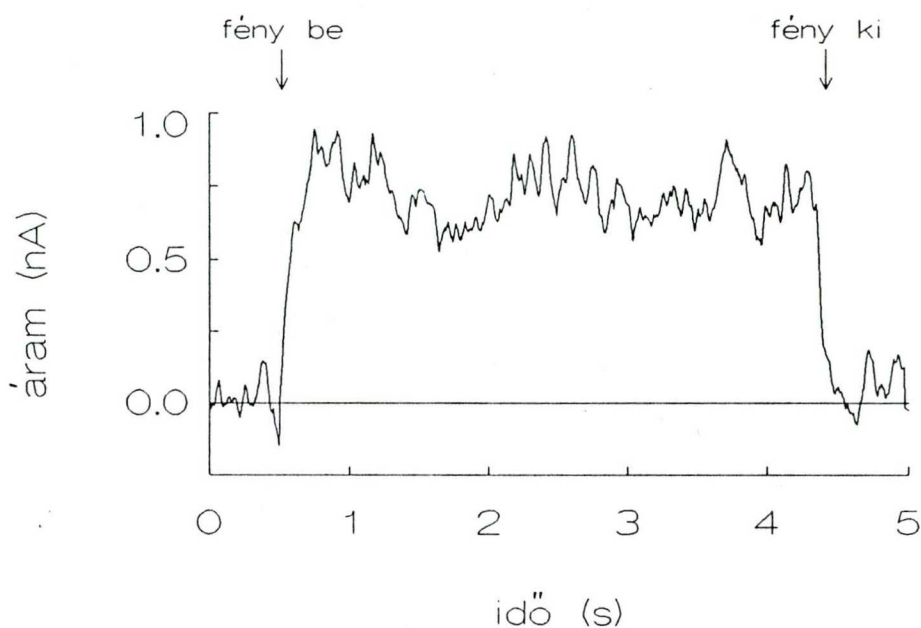


**15. ábra:**

**A folytonos fotoáram amplitúdójának (●), illetve a savas bíbor forma koncentrációjának (○) pH-függése.**

A pH-t sósavval állítottuk, majd a  $\text{Cl}^-$  koncentráció állandó értéken tartásához (310 mM) megfelelő mennyiségű  $\text{NaCl}$ -ot is adtunk az oldathoz. A savas-bíbor tartalom meghatározásához a következő módszert alkalmaztuk: két referencia spektrumot mértünk, nevezetesen 1 M  $\text{HCl}$ -ban (savas-bíbor forma), illetve 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -ban (savas-kék forma). Az így kapott referenciaspektrumokat különböző súlyokkal összeadva kevertük ki eztán az abszorpciós spektrumokat. Az illesztés jóságát vizuálisan ellenőriztük.

Jól látható, hogy az áram mindvégig stabil marad, ami bizonyítja, hogy ezen körülmények között töltéstranszport van. Az áram előjele megegyezik a semleges pH-n mérhető áram előjével. [151]-ben már felmerült, hogy alacsony pH-n ez az iontranszport a bR savas-bíbor formájához kapcsolható. Eltérő abszorpciós spektruma révén ez a forma elkülöníthető a savas-kék formától. A 15. ábra a folytonos áram amplitúdója és a savas-bíbor forma pH-val változó koncentrációja közötti korrelációt mutatja.

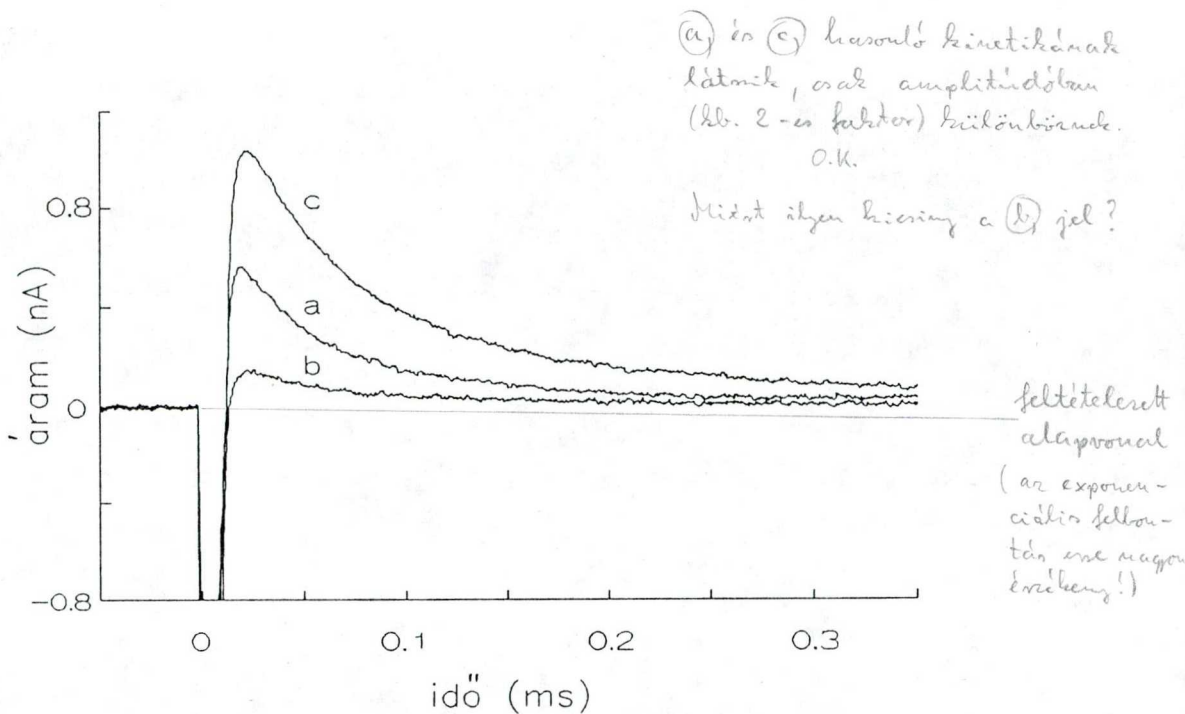


16. ábra:

Folyamatos fényvel létrehozott fotoáram (pH=0.5 HBr-dal beállítva).

A savas bíbor formát HBr-dal létrehozva szintén mérhető folytonos megvilágítás hatására létrejövő elektromos áram (16. ábra). Ennek iránya megegyezik a HCl-as mintán mért elektromos áram irányával, de amplitúdója kisebb, annak mintegy harmada. Ez részben azzal magyarázható, hogy a HBr-os mintán mérhető tranziens jelek időállandója nagyobb (4. táblázat), azaz lassabb a fotociklus, másrészt az erős fény hatására elkerülhetetlenül létrejövő fakulás ezen a mintán szemmel láthatóan nagyobb mértékű volt.

Hogy megállapíthassuk, hogy alacsony pH-n milyen jellegű izotóp effektus jelenik meg, tranziens fotoelektromos jeleket mértünk olyan mintákon, ahol a pH-t HCl-val, HBr-dal, illetve  $^2\text{HCl}$ -dal állítottuk be (17. ábra).



17. ábra:

**Az alacsony pH-n mért tranziens fotoelektromos jelek.**

a, pH=0.5 HCl-val; b, pH=0.5 HBr-dal; c,  $p^2H=0.5$   $^2HCl$ -dal beállítva. Az időfeloldás 40  $\mu s$ /csatorna.

Jónegység (ha  $Br^-$  van jelen)?  
 szisztematikus mérséklés a  $[Br^-]$  koncentrációjának változtatásával jó lett volna!

pD mérték ilyen kis értékeknél?  
 (0.41-es konverzió itt is jó?)

Az eredmények számítógépes elemzése azt mutatta, hogy HBr-ban a kinetika sebesség-meghatározó lépései lényegesen lassabbak, mint a másik két esetben. A kiértékelés eredményét a 4. táblázat összegzi.

A többi mérést is figyelembe véve megállapítható, hogy míg a  $^2HCl$ -os, illetve HCl-as minták esetén kapott időállandók gyakorlatilag megegyeznek, azaz izotóp effektus nem észlelhető, addig a két lassabb komponens időállandója HBr-ban nagyobb.

Mivel általánosan elfogadott az, hogy a protonpumpa-aktivitás az M forma megjelenéséhez - amely a Schiff-bázis deprotonálódásának eredménye - szorosan kapcsolódik, abszorpciókinetikai méréseket is végeztünk, mind semleges pH-n

4. táblázat:

A 15. ábrán látható tranziens fotoáramok kinetikai analízisének eredménye.

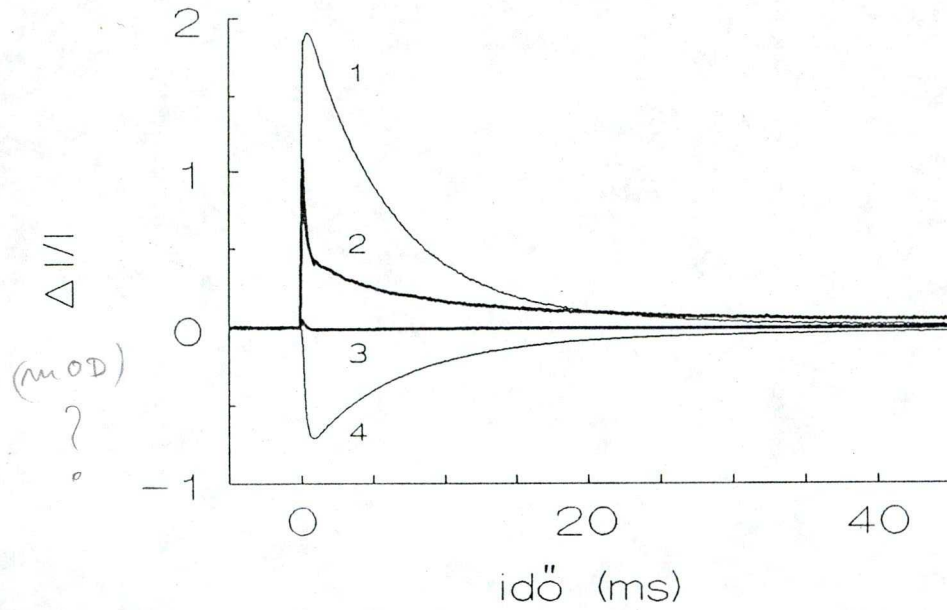
*A felbontás minicitása?*

Időállandók	HBr	HCl	<sup>2</sup> HCl
$\tau_1$	$(5.3 \pm 2.3) \cdot 10^{-5}$ (1.9)	$(5.3 \pm 1.8) \cdot 10^{-5}$ (8.2)	$(8.3 \pm 2.7) \cdot 10^{-5}$ (20.1)
$\tau_2$	$(3.7 \pm 0.9) \cdot 10^{-3}$ (14.3)	$(9.2 \pm 3.3) \cdot 10^{-4}$ (6.0)	$(8.9 \pm 5.9) \cdot 10^{-4}$ (8.7)
$\tau_3$	$(1.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$ (3.1)	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$ (15.1)	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$ (20.4)

Az itt szereplő adatok a 3. táblázathoz hasonlóan értelmezendők.

*nagyon eltérő  
amplitúdó éppen  
amiatt a komponensekkel, ahogyan  
effektus várható*

(pH=7, 310 mM NaCl), mind alacsony pH-n (pH=0.5, HCl-val beállítva) olyan hullámhosszakon, ahol az M forma ( $\lambda=410$  nm), illetve a bR alapállapot ( $\lambda=570$  nm) megjelenése, illetve koncentrációjának időbeli változása jól detektálható (18. ábra). Ezen látható, hogy a bR alapállapot eltűnését, illetve visszatérését tükröző 570 nm-es jel amplitúdója a különböző körülmények esetén is összemérhető, azaz nincsen nagyon jelentős különbség semleges, illetve alacsony pH-n a fotociklusban résztvevő bR molekulák száma között. Ezzel szemben alacsony pH-n az M forma gyakorlatilag nem jelenik meg. Ezeket az adatokat [66] is megerősíti.



18. ábra:

Abszorpciókinetikai mérések 570, illetve 410 nm-en.

- 1, 570 nm, pH=7, 310 mM NaCl; 2, 570 nm, pH=0.5 HCl-val állítva;  
 3, 410 nm, pH=0.5 HCl-val állítva; 4, 410 nm, pH=7, 310 mM NaCl.

Hűlés (mért) pH  $\leftrightarrow$  melegítés (gyébeli) pH  
 1, pufferező csoportok hatása  
 2, negatív membránpotenciál

Alacsony pH hatása a bR mérésére?  
 (tömlény sósav)

## 7. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE:

Milyen bizonyítékok állnak rendelkezésére az aniontranszportra nagyon alacsony pH-n? Következésképp (pl. izotópjelöléssel) nem lehetne mérni a transzportált  $\text{Cl}^-$ -t?

Az általunk mért elektromos jelek egyértelműen azt mutatják, hogy igen alacsony pH-n  $\text{Cl}^-$ , illetve  $\text{Br}^-$  ionok jelenlétében fényindukált töltéstranszport észlelhető. A kérdés az, hogy ezt a töltést milyen ionok szállítják. Dér András és munkatársai vetették fel azt a lehetőséget, hogy ilyen körülmények között - pH $\approx$ 0.5, HCl-val beállítva - az eddig csak protonpumpaként ismert bR valószínűleg  $\text{Cl}^-$  ionokat transzportál [151]. Vizsgáljuk meg ezt a lehetőséget az elvégzett kísérletek alapján.

A neutrális pH-ra általánosan elfogadott fotociklus során az alapállapotban transz geometriájú kromofór a fény hatására 13-cisz konfigurációba izomerizálódik, majd ez az állapot termikus gerjesztésű reakciók sorozatán keresztül relaxál. Ezalatt a Schiff-bázis protonja leválik és kilökődik a membrán extracelluláris oldalán (feltehetően az L  $\rightarrow$  M átmenetben). Ezt követően - valószínűleg az N  $\rightarrow$  O átmenetben - az ellentétes oldalról egy másik proton kötődik be. A Schiff-bázis deprotonálódása az abszorpciós spektrum  $\sim$ 150 nm-es kékeltolódását eredményezi (M forma). Mivel a  $\text{bR}_{564}^{\text{HCl}}$  fotociklusában M forma megjelenése nem észlelhető (18. ábra), így ez bizonyítékként szolgálhatna a proton transzport ellenében. Az M forma hiánya azonban önmagában nem lehet kizáró ok, mivel jogosan feltételezhető az, hogy alacsony pH-n a protonleadás lelassul, a felvétel pedig felgyorsul. Ilyen esetben az M forma gyakorlatilag nem detektálható, mivel kialakulása lassabb, mint a bomlása. Másrészt azonban még ha le is játszódna a fotociklus során protonfelvétel és -leadás, akkor sem lehetne kizárni azt a lehetőséget, hogy - ettől függetlenül - nem protonok, hanem  $\text{Cl}^-$  ionok transzportálódnak.

Tegyük fel, hogy az alacsony pH-n transzportált ion proton. Ekkor a kinetika semleges pH-hoz hasonló, jelentős mértékű (körülbelül kétszeres) lassulását várnánk a  $\text{H}_2\text{O}$ -et  $^2\text{H}_2\text{O}$ -ra cserélve. Ezt azonban nem észleltük (17. ábra). Önmagában azonban még egy ilyen jellegű izotóp-effektus hiánya sem

tekinthető perdöntőnek, mivel nem zárható ki, hogy a  $bR_{564}^{HCl}$  esetében nem a protonfelvétel, illetve leadás sebessége, hanem más, az iontranszporthoz szükséges folyamatok, mint pl. a fehérje vagy a kromofór konformációváltozásának sebessége határozzák meg a pumpa eredő sebességét. Ha figyelembe vesszük azonban azt a másik eredményt is, ami szerint a  $Cl^-$  ionok  $Br^-$ -ra cserélése savas pH-n a ms-os kinetika lassulását, azaz a transzportsebesség csökkenését eredményezi, akkor mindezen érvek együttesen már erősen arra mutatnak, hogy alacsony pH-n a bR valóban képes anionok transzportjára is. Ha ezt elfogadjuk, akkor - mivel a  $bR_{568}$ , illetve  $bR_{564}^{HCl}$  esetén mért elektromos jelek előjele megegyezik - azt is megállapíthatjuk, hogy a  $Cl^-$  ionok a protonokkal ellentétes irányba, a sejt belseje felé transzportálódnak, és ez az irány megegyezik a hR-beli  $Cl^-$  transzport irányával.

jó az évek-  
és, mert  
a  $H^+$  trans-  
port nem  
diffúzió-  
limitált.

Ez az  
egyik  
"évek" az  
aniontrans-  
portra?

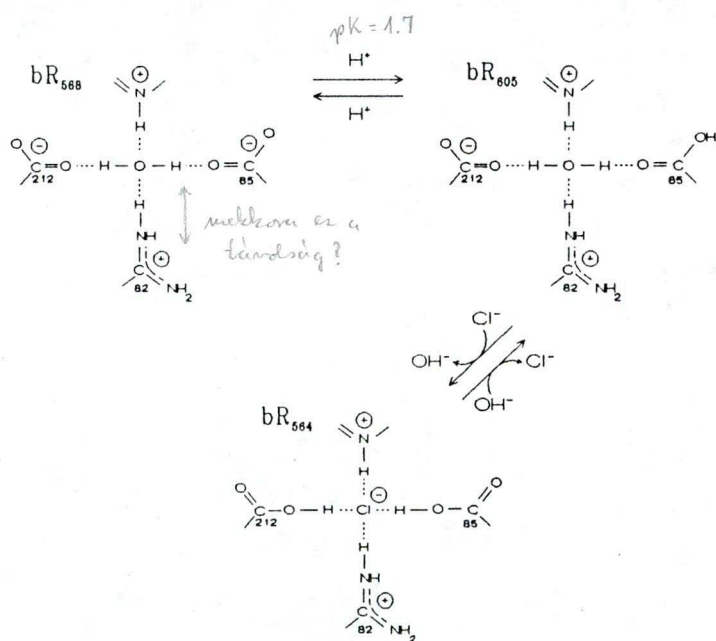
Ez a következtetés alapvető jelentőségű a bR működésének megértésében és annál is érdekesebb, mivel a bR-nal szoros szerkezeti rokonságot mutató hR semleges pH-n halogenid ionokat transzportál. Ez az eredmény kiemeli annak jelentőségét, hogy szükséges egy olyan modell kidolgozása, amely a kísérleti eredményeket megfelelően értelmezi, és amelynek felhasználásával megmagyarázható a kétféle, alapvetően különböző típusú iontranszport ezekben az egyébként igen hasonló fehérjékben. Erre teszünk kísérletet a továbbiakban.

Modellünk azon az elképzelésen alapul, hogy egy töltéspár egyaránt szolgálhat anion-, illetve kation-kötőhelyként és az elektromos tér ugyanazon lokális megváltozása ellentétes irányba mozgathatja ezeket az ionokat. Egy ilyen komplex léte esetén a fehérjeszerkezet kismértékű megváltozásai, - amelyek pl. a kötődés erősségét, vagy a transzportban szerepet játszó folyamatok aktivációs energiáját változtatják - , határozhatják meg, hogy az adott körülmények között milyen ion transzportálódik.

A  $bR_{568} \rightarrow bR_{605} \rightarrow bR_{564}^{HCl}$  átmenetekben tapasztalt opszin-eltolódás megmagyarázható a  $bR_{568}$  kromoforra általánosan elfogadott modell alapján, amely szerint az abszorpciós maximum helyét elsősorban a Lys-216-hoz való



kötődést biztosító Schiff-bázis protonáltsága, illetve a Schiff-bázis és a környezetében található töltött csoportok közötti kölcsönhatás erőssége határozza meg. Mágneses magrezonancia mérések alapján jutottak arra a következtetésre, hogy a Schiff-bázis közelében feltehetően egy hidrogén kötésekkel kapcsolódó töltéskomplex helyezkedik el, amely számos töltött aminosav oldalláncból és legalább egy vízmolekulából épül fel [49,50]. A nemrégiben közölt igen részletes szerkezet, illetve különféle bR mutánsokon végzett vizsgálatok arra mutatnak, hogy az Asp-85, Asp-212, illetve Arg-82 a komplexben a legfontosabb aminosavak, míg feltehető, hogy Tyr-57 és Tyr-185 is szerepet játszanak (lásd a 2.1.2 AZ OPSZIN SZERKEZETE című fejezetet). Az általunk a kötőhely szerkezetére javasolt modell a 19. ábrán látható.



19. ábra:

A javasolt ellenion szerkezet a bR különböző savas formáiban.

bR<sub>568</sub>: normál bR (pH=7); bR<sub>605</sub>: savas-kék bR; bR<sub>564</sub>: savas-bíbor bR.



Ennek elfogadásával legalábbis kvalitatívan értelmezhető a különböző savas formák abszorpciós maximumának helye. Ismert, hogy a  $bR_{568} \rightarrow bR_{605}$  átmenet során protonfelvétel játszódik le [65]. Ez a proton feltehetően beépül a töltéskomplexbe (19. ábra), leárnyékolva az ott lévő negatív töltések egy részét. Mivel ezáltal gyengül az ellenion és a Schiff-bázis közötti kölcsönhatás, ezért az abszorpciós spektrum a vörös felé tolódik el. Ily módon megmagyarázható az átmenet alacsony pK-ja ( $pK=1.7$ ), amely semmiképpen nem felel meg semmilyen, egymagában álló aminosav oldallánc esetére várt értéknek sem [59].

Feltételezésünk szerint a  $bR_{605} \rightarrow bR_{564}^{HCl}$  átmenet során egy  $OH^-$  ion cserélődik ki  $Cl^-$ -ra (vagy vízmolekula egy disszociált HCl-ra). Ennek során a hidrogén-kötések száma változatlan marad, a protonok száma eggyel csökken és az Asp-212 protonálódik (19. ábra). Az így létrejött töltéskomplexben az ellenion és a Schiff-bázis közötti kölcsönhatás erőssége nagyjából megegyezik a  $bR_{568}$ -belivel, azaz visszaáll az eredeti bíbor szín. Ezt az elképzelést az a megfigyelés is alátámasztja, hogy a  $bR_{564}^{HCl}$  koncentráció a  $[H^+][Cl^-]$  szorzattal egyenesen arányos [Y. Kimura és W. Stoeckenius eddig nem közölt eredménye]. Mind a  $bR_{568} \rightarrow bR_{605}$ , mind a  $bR_{568} \rightarrow bR_{564}^{HCl}$  átmenetben észlelték a fehérjeszerkezet változását is, amely azonban érdekes módon nem a színváltozással, hanem a pH-val korrelált [50,54], de ezek a konformációváltozások kellőképpen nem ismertek.

Ismert, hogy a BM közepe táján elhelyezkedő Schiff-bázistól a külső tér felé mindkét irányba diffúziós csatornák vezetnek (3. ábra). Tegyük fel, hogy a fotociklus során az L állapotban a Schiff-bázis környezete valamilyen fehérjeszerkezet-változás folytán lokálisan pozitívabb töltésűvé válik, és az így megjelenő elektromos taszítás biztosítja a proton kilökődéséhez szükséges erőt. Ezt a pozitív töltésváltozást létrehozhatja még a retinál teljes, vagy részleges izomerizációja más - a  $C^{13}=C^{14}$ -től különböző - kötés körül, amely csak az  $N \rightarrow O$  átmenet során, a Schiff-bázis reprotonációját követően alakul vissza [6]. A protonpumpa működéséhez szükségesnek tűnik legalább egy alapvető fehérjekonformáció-változás ("reprotonáció kapcsoló"), amely a Schiff-bázison lévő

proton és a külső oldal közti kapcsolatot a deprotonálódást követően megszünteti, és ezzel egyidejűleg lehetővé teszi proton felvételét a citoplazma felől [103]. Időfelbontásos kalorimetriai mérések, illetve újabban Fourier transzformált infravörös spektroszkópiái adatok, valamint abszorpciókinetikai mérések arra mutatnak, hogy az M állapotban [84,109,113,152], illetve azt követően valóban lejátszódik egy nagy fehérjekonformáció-változás [115,111].

Ezzel szemben a  $bR_{564}^{HCl}$ -ben az ellenion nem képes újabb proton felvételére, ezért [153]-hoz hasonlóan feltesszük, hogy a fotociklus első lépései során a komplexben lévő  $Cl^-$  ion a fent említett lokális pozitív töltéstöbblet megjelenése miatt erősebben kötődik a protonált Schiff-bázishoz. Elég erősen ahhoz, hogy együtt mozogjon a Schiff-bázissal a fehérjekonformáció-változás során, amely a citoplazma felőli oldallal való kapcsolatot létrehozza.

Ezt követően egy negatívabb lokális töltésváltozásra van szükség a Schiff-bázis környezetében ahhoz, hogy a  $Cl^-$  iont kutaszítsa a membránból, vagy hogy egy protont vonzzon a citoplazma felőli oldalról. Sajnos a  $bR_{568}$  szerkezet nem használható fel ahhoz, hogy az utóbbi folyamatban résztvevő csoportokat azonosítsuk, az előbbieken vázolt nagymérvű fehérjekonformáció-változás miatt. Ismerve azonban azt, hogy a kromofór szerkezete a  $bR_{568}$  fotociklusának L és N állapotában nagyon hasonló [101], feltételezhető, hogy az L állapotbeli komplex ellenionhoz hasonló szerkezetről van szó az N állapotban is, amelynek kialakításában akár ugyanazon csoportok némelyike is részt vehet. Egy ilyen komplex hasonló mechanizmust tenne lehetővé proton felvételre és  $Cl^-$  ion leadásra. A kötőhelynek része lehet a Thr-89, valamint Asp-115, Arg-175 és Arg-134, bár ez utóbbiak pontmutációval való kicserélése a protonpumpát csak részben inaktíválta [41,83,154]. Az Asp-96 részvétele - amelyről feltételezik, hogy protondonor lehet a Schiff-bázis protonálódásához - kevéssé valószínű, mert  $pH=0.5$ -ön nem lehet képes protonjának leadására és így a fentiekben posztulált negatív lokális töltésváltozást létrehozni. Meg kell még azt is jegyezni, hogy a feltételezett lokális elektromos térbeli változásnak nem szükséges a Schiff-bázis közvetlen

közelében lezajlania, mivel bármilyen, a jonon-gyűrű közelében végbemenő töltéselmozdulás - a retinál konjugált kettőskötés rendszerén keresztül - áttevődik a Schiff-bázisra is.

Amennyiben valóban a javasolt mechanizmus játszódik le, megmagyarázható, hogy a  $bR_{568}^{HBr}$  kinetikáját a  $bR_{564}^{HCl}$ -hez hasonlítva miért nincs meg a  $bR_{568}$ -nál az  $L \rightarrow M$  átmenetben észlelt nagy  $^2H^+$  effektushoz hasonló izotóp effektus. Ugyanis míg a  $bR_{568}$ -ban a transzportált proton a fotociklus kezdetén a membrán belsejéből lökődik ki, addig  $bR_{564}^{HCl}$ -ben, illetve  $bR_{568}^{HBr}$ -ban az anion már a Schiff-bázis közelében kötött és nem mozdul el jelentős távolságra akkor, amikor a lokális elektromos tér megváltozik. Az ezt követő konformációváltozást, amely a Schiff-bázist a citoplazma felőli oldalhoz kapcsolja, valószínűleg nem befolyásolja a transzportált ion tömege. Meg kell jegyezni azt, hogy ez a mechanizmus két L-szerű intermediert eredményez a savas-bíbor formák esetén. Ezeket azonban feltehetően még nehezebb lenne detektálni, mint a  $bR_{568}$  fotociklusában hasonló okokból feltételezett két M állapotot.

Kézenfekvő, hogy a javasolt modellt a hR-ra is alkalmazzuk. Mint már a 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS-ben említettük, a hR a bR-hoz hasonlóan hét  $\alpha$ -hélix szegmensből áll, aminosav-szekvenciájuk is nagyfokú homológiát mutat [14,155,156]. A bR-ben megtalálható Asp-85-öt a hR szekvenciában a Thr-111 helyettesíti, míg az Arg-82, illetve Asp-212-nek megfelelő aminosavak a hR-ban megtalálhatóak. Így a hR-ban is kialakulhat egy, a bR-belihez hasonló ellenion komplex, amely a Schiff-bázist semleges pH-n is protonált állapotban tudja tartani. A Thr-89 helyett a hR-ban egy szerin található, míg az Asp-115, Arg-175 és Arg-134 megőrződtek. A két fotociklusban a retinálnak ugyanazon izomerizációja megy végbe, és ismert, hogy a kromofór szerkezete az egyes L intermedierekben csaknem azonos [157]. Abszorpciókinetikai mérésekben észlelték, hogy a ms-os komponensekben a  $Cl^-$  ionok  $Br^-$ -ra cserélése a bR-hoz hasonló jelentős változást idéz elő a transzport sebességében [158], valamint a modellünk alapján feltételezett két L-szerű intermediert észlelték a *Natrono-*

*bacterium Pharaonis* törzsből izolált hR esetén [159]. Mint már a 3. HALORODOPSZIN: Összehasonlítás a baktriorodopszinnal című fejezetben említettük, a hR elektromos válaszjelét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a  $\text{Cl}^-$  koncentráció változtatásával csak a leglassabb, milliszekundumos időállandójú jelhez tartozó terület változott, ami alapján a  $\text{Cl}^-$  transzportot ehhez a lépéshez kapcsoltuk. Ez egybevág azzal, hogy a  $\text{bR}_{564}^{\text{HCl}}$  elektromos jelében szintén a lassabb komponensek változtak a  $\text{Cl}^-$  ionokat  $\text{Br}^-$ -ra cserélve. Ezzel szemben nem világos még az, hogy a  $\text{Cl}^- - \text{Br}^-$  csere esetén az abszorpciós maximumban, illetve rezonancia-Raman spektrumban várható különbségek miért nem jelennek meg [160,161], illetve hogyan illeszkedhet a komplex kötőhelyre a  $\text{NO}_3^-$  ion, amennyiben az valóban transzportálódik, mint azt [159] állítja. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy a  $\text{hR}_{580}$  kromofór  $\text{Cl}^-$  ionok teljes hiányában nem tartható fenn [162], így a jelenlévő  $\text{Cl}^-$  ionok hatása problémát okozhat.

A fentiekben vázolt modell természetesen spekulatív és rendkívül leegyszerűsített, de ésszerű magyarázatot ad arra, hogyan lehetséges a proton transzportról anion transzportra váltás ugyanazon fehérjében, kizárólag a pH megváltoztatása révén. Mivel a bR és a hR fotociklusában megjelenő intermedierek elegendően nagy feloldású szerkezete a közeljövőben nem valószínű, hogy ismertté válik, ezért a kutatás fő iránya várhatóan a pontmutánsok transzportaktivitásának vizsgálata lesz. A fenti, illetve az ehhez hasonló modellek megalkotása azonban sugallhatja, hogy a jövőben milyen mutánsok előállítására lehet célszerű.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

Elsőként Dér Andrásnak szeretnék köszönetet mondani, akitől pályakezdőként a legtöbb segítséget kaptam, és akitől az együtt töltött évek során nagyon sokat tanultam. A dolgozat tárgyát képező témát az ő ötlete indította el, és a mérések, illetve az eredmények értékelése során is mindvégig szorosán együttműködtünk.

Köszönetet szeretnék mondani Keszthelyi Lajosnak, amiért lehetővé tette, hogy az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetének munkatársa lehessen, és a bR kutatásokba bekapcsolódjak. Köszönöm, hogy a dolgozatban közölt munka során mindvégig közvetlen munkatársamként is tisztelhettem.

Ormos Pálnak és Váró Györgynek köszönhetem, hogy a biofizikával kapcsolatba kerültem. Ők azok, akiknek volt türelmük ahhoz, hogy diákként foglalkozzanak velem és első lépéseimet egyengessék. Őket terheli a felelősség azért is, hogy a tudományos kutatói pályára alkalmasnak ítélték. Ormos Pálnak külön köszönöm, hogy mindig kész volt arra, hogy a munkámmal (és minden egyébgel) kapcsolatos problémában segítségemre legyen.

Végül - de nem utolsósorban - Walther Stoeckenius-nak mondok köszönetet, akinek a dolgozatban közölt mérések értelmezésében meghatározó szerepe volt. Az eredmények jelentős része az ő san francisco-i, illetve később santa cruz-i laboratóriumában született.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK:

1. Mitchell, P. (1961) Nature 191,144-148.
2. Oesterhelt, D. és W. Stoeckenius (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2853-2857.
3. Stoeckenius, W. és R. Bogomolni (1982) Ann. Rev. Biochem. 52,587-616.
4. Dencher, N.A. (1983) Photochem. Photobiol. 38,753-767.
5. Stoeckenius, W. (1985) Trends Biochem. Sci. 10,483-486.
6. Mathies, R., S.W. Lin, J.B. Ames és W.T. Pollard (1991) 20,491-518. ← *folyóirat neve?*
7. Oesterhelt, D. és G. Krippahl (1973) FEBS Lett. 36,72-76.
8. Bogomolni, R.A. és J.L. Spudich (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79,6250-6254.
9. Spudich, J.L. és R.A. Bogomolni (1984) Nature 312,509-513.
10. Spudich, J.L. és R.A. Bogomolni (1988) Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17,193-215.
11. Weber, H.J. és R.A. Bogomolni (1981) Photochem. Photobiol. 33,601-608.
12. Lanyi, J.K. (1986) Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15,11-28.
13. Lanyi, J.K. (1990) Physiol. Revs. 70,319-330.
14. Oesterhelt, D. és J. Tittor (1989) Trends Biochem. Sci. 14,57-61.
15. Henderson, R.J. (1975) J. Mol. Biol. 94,123-138.
16. Blaurock, A.E. és W. Stoeckenius (1971) Nature 233,152-155.
17. Ovchinnikov, Y.A., N.G. Abdulaev, M.Y. Feigina, M.Y. Kiselev és N.A. Lobanov (1979) FEBS Lett. 100,219-224.

18. Khorana, H.G., E. Gerber, W.C. Herlihy, C.P. Gray, P.J. Anderegg, K. Nihei és K. Biemann (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76,5046-5050.
19. Dunn, R., J. McRoy, M. Simsek, A. Majumdar, S.H. Chang, V.L. Rajbhandary és H.G. Khorana (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76,6744-6749.
20. Henderson, R., P.N.T. Unwin (1975) *Nature* 257,28-32.
21. Henderson, R., J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann és K.H. Downing (1990) *J. Mol. Biol.* 213,899-929.
22. Konishi, T., L. Packer (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72,1437-1442.
23. Huang, K.-S., M. Liao, C.M. Gupta, N. Royal, K. Biemann (1982) *J. Biol. Chem.* 257,8596-8599.
24. Lewis, A., J. Spoonhower, R. Bogomolni, R. Lozier, W. Stoeckenius (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71,4462-4466.
25. Scherrer, P., M.K. Matthew, W. Sperling, W. Stoeckenius (1989) *Biochemistry* 28,829-834.
26. Heyn, M.P., J. Westerhausen, I. Wallat, F. Seiff (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,2146-2150.
27. Earnest, T.N., P. Roepe, M.S. Braiman, J. Gillespie, K.J. Rothschild (1986) *Biochemistry* 25,7793-7798.
28. Fahmy, K., F. Siebert, M.F. Grossjean, P. Tavan (1989) *J. Mol. Struct.* 214,257-258.
29. Heyn, M.P., Cherry, R.J., U. Müller (1977) *J. Mol. Biol.* 117,607-620.
30. Lin, S.W., Mathies, R. (1989) *Biophys. J.* 56,653-660.
31. Barabás K., A. Dér A., Zs. Dancsházy, P. Ormos P, L. Keszthelyi és Marden M (1983) *Biophys. J.* 43,5-11.
32. Hauss, T., S. Grzesiek, H. Otto, J. Westerhausen, M.P. Heyn (1990) *Biochemistry* 29,4904-4913.
33. Nakanishi, K., V. Balogh-Nair, M. Arnoldi, K. Tsujimoto, B. Honig (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102,7945-7947.
34. Harbison, G.S., J. Herzfeld, R.G. Griffin (1983) *Biochemistry* 22,1-5.



35. Spudich, J.L., D.A. McCain, K. Nakanishi, M. Okabe, N. Shimizu, H. Rodman, B. Honig, R.A. Bogomolni (1986) *Biophys. J.* 49,479-483.
36. Lugtenburg, J., M. Muradin-Szweykowska, C. Heeremans, J.A. Pardoen, G.S. Harbison, J. Herzfeld, R.G. Griffin, S.O. Smith, R.A. Mathies (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108,3104-3105.
37. Ottolenghi, M., M. Sheves (1989) *J. Membr. Biol.* 112,193-212.
38. Van der Steen, R., P.L. Biesheuvel, R.A. Mathies, J. Lugtenburg (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108,6410-6411.
39. 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.
40. Braiman, M.S., T. Mogi, T. Marti, L.J. Stern, H.G. Khorana, K.J. Rothschild (1988) *Biochemistry* 27,8516-8520.
41. Mogi, T., L.J. Stern, T. Marti, B.H. Chao és H.G. Khorana (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,4148-4152.
42. Subramaniam, S., T. Marti és H.G. Khorana (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,1013-1017.
43. Rothschild, K., D. Gray, T. Mogi, T. Marti, L.J. Stern, M.S. Braiman és H.G. Khorana (1989) *Biochemistry* 28,7052-7059.
44. Blanck, A., D. Oesterhelt (1987) *EMBO J.* 6,265-273.
45. Blanck, A., D. Oesterhelt, E. Ferrando, E.S. Schegk, F. Lottspeich (1989) *EMBO J.* 8,3963-3971.
46. Mogi, T., T. Marti és H.G. Khorana (1989) *J. Biol. Chem.* 264,14197-14201.



47. 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.
48. Braiman, M.S., T. Mogi, T. Marti, L.J. Stern, H.G. Khorana és K.J. Rothschild (1988) Biochemistry 27,8516-8520.
49. DeGroot, H.J.M., G.S. Harbison, J. Herzfeld, R.G. Griffin (1989) Biochemistry 28,3346-3353.
50. DeGroot, H.J.M, S.O. Smith, J. Courtin, C. Winkel, E. VanDenBerg, R.G. Griffin, J. Lugtenberg, J. Herzfeld. (1990) Biochemistry 29,6873-6883.
51. Birge, R.R., C.F. Zhang (1990) Journal of Chemical Physics 92,7179-7195.
52. Lussier, L.S., A. Dion A, C. Sandorfy, H. Le-Thanh, D. Vocelle (1986) Photochem. Photobiol. 44,629-639.
53. Hildebrandt, P., M. Stockburger (1984) Biochemistry 23,5539-5548.
54. Kimura, Y., A. Ikegami és W. Stoeckenius (1984) Photochem. Photobiol. 40,641-646.
55. Mowery, P.C., R.H. Lozier, Q. Chae, Y-W. Tseng, M. Taylor és W. Stoeckenius (1979) Biochemistry USA 18,4100-4107.
56. Chang, C.-H., R. Jonas, S. Melchiorre, R. Govindjee és T.G. Ebrey (1986) Biophys J. 49,731-739.
57. Dunach, M., E. Padros, M. Seigneuret és J.-L. Rigaud (1988) J. Biol. Chem. 263,7555-7559.
58. Jang, D.-J.és M.A. El-Sayed (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,5918-5922.

59. Szundi, I. és W. Stoeckenius (1989) *Biophys. J.* 56,369-383.
60. Heyn, M., C. Dudda, H. Otto, F. Seiff és I. Wallat (1989) *Biochemistry* 28,9166--9172.
61. Janf, D.-J., M.A. El-Sayed, L.J. Stern, T. Mogi és H.G. Khorana (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,4103-4107.
62. Smith, S.O. és R.A. Mathies (1985) *Biophys. J.* 47,251-254
63. Otto, H., T. Marti, M. Holz, T. Mogi, L.J. Stern, F. Engel, H.G. Khorana és M. Heyn (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,1018-1022.
64. Fischer, U. és D. Oesterhelt (1979) *Biophys. J.* 28,211-230.
65. Mowery, P.C., R.H. Lozier, Q. Chae, Y.-W. Tseng, M. Taylor és W. Stoeckenius (1979) *Biochemistry* 18,4100-4107.
66. Váró, Gy. és J.K. Lanyi (1989) *Biophys. J.* 56,1143-1151.
67. Lozier, R.H., R.A. Bogomolni és W. Stoeckenius (1975) *Biophys. J.* 15,955-962.
68. Nagle, J.F., L.A. Parodi és R.H. Lozier (1982) *Biophys. J.* 38,161-174.
69. Nuss, M.C., W. Zinth, W. Kaiser, E. Kolling és Oesterhelt (1985) *Chem. Phys. Lett.* 117,1-7.
70. Petrich, J.W., J. Breton, J.L. Martin és A. Antonetti (1987) *Chem. Phys. Lett.* 137,369-375.
71. Polland, H.-J., M.A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kolling és D. Oesterhelt (1986) *Biophys. J.* 49,651-662.

72. Sharkov A.V., A.V. Pakulev, S.V. Chekalin és Y.A. Matveetz (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 808,94-102.
73. Kung, M.C., D. Devault, B. Hess és Oesterhelt (1975) *Biophys. J.* 15,907-911.
74. Dancsházy, Zs., R. Govindjee, B. Nelson és T.G. Ebrey (1986) *FEBS Lett.* 209,44-48.
75. Drachev, L.A., A.D. Kaulen, V.P. Skulachev és V.V. Zorina (1987) *FEBS Lett.* 226,139-144.
76. Diller, R. és M. Stockburger (1988) *Biochemistry* 27,7641-7651.
77. Kouyama, T., A. Nasuda-Kouyama, A. Ikegami, M.K. Mathew és W. Stoeckenius (1988) *Biochemistry* 27,5855-5863.
78. Hanamoto, J., P. Dupuis és M. El-Sayed (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81,7083-7087.
79. Dancsházy Zs., R. Govindjee és T.G. Ebrey (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6358-6361.
80. Diller, R. és M. Stockburger (1988) *Biochemistry* 27,7641-7651.
81. Bitting, H.C., D.-J. Jang és M.A. El-Sayed (1990) *Photochem. Photobiol.* 51,593-598.
82. Butt, H.-J., K. Fendler, A. Dér és E. Bamberg (1989) *Biophys. J.* 56,851-859.
83. Ames, J.B. és R.A. Mathies (1990) *Biochemistry* 29,7181-90.
84. Váró Gy. és J.K. Lanyi (1990) *Biochemistry* 29,2241-2250.
85. Váró Gy. és J.K. Lanyi JK. (1991) *Biochemistry* 30,5008-5015.

86. Váró, Gy. és J.K. Lanyi (1991) *Biochemistry* 30,5016-5022.
87. Smith, S.O., M.S. Braiman, A.B. Myers, J.A. Pardoen, J.M.L. Courtin és C. Winkel, J. Lugtenburg és R.A. Mathies (1987) *J. Amer. Chem. Soc.* 109,3108-3125.
88. Rodman-Gilson, H.S., B.H. Honig, A. Croteau, G. Zarrilli és K. Nakanishi (1988) *Biophys. J.* 53,261-269.
89. Smith, S.O., A.B. Myers, R.A. Mathies, J.A. Pardoen, C. Winkel, E. van den Berg és J. Lugtenburg (1985) *Biophys. J.* 47,653-664.
90. Harbison, G.S., J. Herzfeld, R.G. Griffin (1983) *Biochemistry* 22,1-5.
91. Brack, T.L. és G.H. Atkinson (1989) *J. Molec. Structure* 214,289-303.
92. Braiman, M.S. és R. Mathies (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79,403-407.
93. Hsieh, C.-L., M.A. El-Sayed, M. Nicol, M. Nagumo, J.-H. Lee (1983) *Photochem. Photobiol.* 38,83-94.
94. 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.
95. Rothschild, K.J., P. Roepe, P. Ahl, T.N. Earnest, R.A. Bogomolni, S.K. Das Gupta, C.M. Mulliken és J. Herzfeld (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83,347-351.
96. 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.
97. Schulten, K. és P. Tavan (1978) *Nature* 272,85-86.
98. Smith, S.O., I. Hornung, R. van der Steen, J.A. Pardoen, M.S. Braiman, J. Lugtenburg és R.A. Mathies (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83,967-971.

99. Ames, J.B., S.P.A. Fodor, R. Gebhard, E.M.M. van den Berg, J. Herzfeld, J. Lugtenburg és R.A. Mathies (1989) *Biochemistry* 28,3681-3687.
100. Deng, H., C. Pande, R.H. Callender és T.G. Ebrey (1985) *Photochem. Photobiol.* 41,467-470.
101. Fodor, S.P.A., J.B. Ames, R. Gebhard, E.M.M. van den Berg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg és R.A. Mathies (1988) *Biochemistry* 27,7097-7101.
102. Diller, R. és M. Stockburger (1988) *Biochemistry* 27,7641-7651.
103. Smith, S.O., J.A. Pardoen, J. Lugtenburg, B. Curry és R. Mathies (1983) *Biochemistry* 22,6141-6148.
104. Smith, S.O., J. Lugtenburg és R. Mathies (1985) *J. Memb. Biol.* 85,95-109.
105. Rothschild, K.J. és H. Marrero (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79,4045-4049.
106. Engelhard, M., K. Gerwert, B. Hess, W. Kreutz és F. Siebert (1985) *Biochemistry* 24,400-407.
107. Dollinger, G., L. Einsenstein, S.-L. Lin, K. Nakanishi és J. Termini (1986) *Biochemistry* 25,6524-6533.
108. Gerwert, K., B. Hess, J. Soppa és D. Oesterhelt (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,4943-4947.
109. Gerwert, K., G. Souvignier és B. Hess (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,9774-9778.
110. Braiman, M.S., T. Mogi, T. Marti, L.J. Stern, H.G. Khorana és K.J. Rothschild (1988) *Biochemistry* 27,8516-8520.
111. Ormos, P., K. Chu és J. Mourant (1992) *Biochemistry* (közlésre beküldve).

112. Bagley, K., G. Dollinger, L. Eisenstein, A.K. Singh és L. Zimányi (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79,4972-497.
113. Braiman, M.S., P.L. Ahl és K.J. Rothschild (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,5221-5225.
114. Braiman, M.S., O. Bousche és K.J. Rothschild (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88,2388-2392.
115. Ormos, P. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88,473-477.
116. Lozier, R.H., W. Niederberger, R.A. Bogomolni, S.B. Hwang és W. Stoeckenius (1976) Biochim. Biophys. Acta 440,545-556.
117. Marinetti, T. és D. Mauzerall (1983) Proc. Natl. Sci. USA 80,178-180.
118. Váró, Gy. és J.K. Lanyi (1990) Biochemistry 29,6858-6865.
119. Trissl, H.-W. (1990) Photochem. Photobiol. 793-818.
120. Dancsházy, Zs. és B. Karvaly (1976) FEBS Lett. 72,136-138.
121. Bamberg, E., H.J. Apell, N. Dencher, W. Sperling, H. Stieve és P. Lauger (1979) Biophys. Struct. Mech. 5,277-292.
122. Drachev, L.A., A.D. Kaulen és V.P. Skulachev (1978) FEBS Lett. 87,161-167.
123. Hwang S.B., J.I. Korenbrot és W. Stoeckenius (1977) J. Membrane Biol. 36,137-158.
124. Hong, F.T. és M. Montal (1979) Biophys. J. 25,465-472.
125. Trissl, H.-W. és M. Montal (1977) Nature 266,655-657.

126. Rayfield, G.W. (1983) *Biophys. J.* 41,109-117.
127. Hwang, S.B., J.I. Korenbrot és W. Stoeckenius (1977) *J. Membrane Biol.* 36,115-135.
128. Trissl, H.-W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 723,327-331.
129. Keszthelyi, L. és P. Ormos (1980) *FEBS Lett.* 109,189-193.
130. Keszthelyi, L. és P. Ormos (1983) *Biophys. Chem.* 18,397-405.
131. Keszthelyi, L. és P. Ormos (1989) *J. Membrane Biol.* 109,193-200.
132. Dér, A., P. Hargittai, és J. Simon (1985) *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10,295-300.
133. Keszthelyi, L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 598,429-436.
134. Barabás, K., A. Dér, Zs. Dancsházy, P. Ormos, L. Keszthelyi és M. Marden (1983) *Biophys. J.* 43,5-11.
135. Váró, Gy. (1982) *Acta Biologica Acad. Sci. Hung.* 32,301-310.
136. Groma, G.I., F. Ráksi, G. Szabó és Gy. Váró (1987) *Biophys. J.* 54,77-80.
137. Groma, G.I., G. Szabó és Gy. Váró (1984) *Nature* 308,557-558.
138. Váró, Gy. és L. Keszthelyi (1983) *Biophys. J.* 43,47-51.
139. Stoeckenius, W. és R.A. Bogomolni (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 5,587-615.
140. Lanyi, J.K. (1986) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15,11-28.
141. Blanck, A. és D. Oesterhelt (1987) *EMBO J.* 7,905-911.



142. Falke, J.J., S.I. Chan, M. Steiner, D. Oesterhelt, P. Towner és J.K. Lanyi (1984) *J. Biol. Chem.* 259,2185-2189.
143. Lanyi, J.K., A. Duschl, Gy. Váró és L. Zimányi (1990) *FEBS Lett.* 265,1-6.
144. Lanyi, J.K. (1986) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15,11-28.
145. Oesterhelt, D., P. Hegemann és J. Tittor (1985) *EMBO J.* 4,2351-2356.
146. Lanyi, J.K. és V. Vodyanoy (1986) *Biochemistry* 25,1465-1470.
147. Bamberg, E., P. Hegemann és D. Oesterhelt D (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 773,53-60.
148. Dér, A., K. Fendler, L. Keszthelyi és E. Bamberg (1985) *FEBS Lett.* 187,232-236.
149. Dér, A., S. Száraz és L. Keszthelyi (1992) *J. Photochem. Photobiol.* 15,299-306.
150. Oesterhelt, D. és W. Stoerkenius (1974) *Methods Enzymol.* 31,667-678.
151. Dér, A., R. Tóth-Boconádi és L. Keszthelyi (1989) *FEBS Lett.* 259,24-26.
152. Ort, D.R. és W. Parson (1979) *Biophys. J.* 25,355-364.
153. Oesterhelt, D., P. Hegemann, P. Tavan és K. Schulten (1986) *Eur. J. Biophys.* 14,123-129.
154. Stern, L.J. és H.G. Khorana (1989) *J. Biol. Chem.* 264,14202-14208.
155. Lányi, J.K., L. Zimányi, K. Nakanishi, F. Derguini, F. Okabe és B. Honig (1988) *Biophys. J.* 53,185-191.
156. Blanck, A. és D. Oesterhelt (1987) *EMBO J.* 6,265-273.
157. Fodor, S.P.A., R.A. Bogomolni és R.A. Mathies (1987) *Biochemistry* 26,6775--6778.
158. Schobert, B. és J.K. Lanyi (1982) *J. Biol. Chem.* 257,10306-10313.

159. Duschl, A., J.K. Lányi és L. Zimányi (1990) *J. Biol. Chem.* 265,1261-1267.
160. Steiner, M., D. Oesterhelt, M. Arika és J.K. Lanyi (1984) *J. Biol. Chem.* 259,2179-2184.
161. Pande, C., J.K. Lanyi és R.H. Callender (1989) *Biophys. J.* 55,425-431.
162. Steiner, M., D. Oesterhelt, M. Arika és J.K. Lanyi (1984) *J. Biol. Chem.* 259,2179-2184.