

*Fehérjékben lejátszódó fizikai folyamatok
dinamikája kinetikus abszorpciós spektroszkópiával
vizsgálva*

Ph.D. disszertáció tézisei

Petro Khoroshyy

Témavezető: Prof. Zimányi László

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Biológia Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

2013
Szeged

Bevezetés

A fehérjéken belüli és a fehérjék közötti elektrontranszfer főleg az élő szervezetek energiaháztartásában betöltött szerepéről ismert. A Marcus elmélet kapcsolatot teremt az elektrontranszfer sebessége, valamint annak hajtóereje (a donor-akceptor pár elektrontranszfer előtti és utáni egyensúlyi állapotának szabadentalpia-különbsége) és a reorganizációs energia között. Ezenfelül az elektrontranszfer sebessége exponenciálisan csökken a donor és akceptor közötti távolsággal. Az ezt jellemző lecsengési állandó nem triviális módon függ a donort és akceptort összekötő közegetől is. Több elméletet javasoltak már arra vonatkozóan, hogy a fehérje anyaga hogyan szabályozza a lecsengési állandót, és bármilyen új kísérleti adat hozzásegíthet a folyamatok jobb megértéséhez, az elmélet finomításához. Számos elektrontranszfer folyamat, mely molekulák vagy kofaktorok redox állapotának változását eredményezi, egyben ezek abszorpciós spektrumában is változást okoz, és így lehetővé válik a jelenség kinetikus abszorpciós spektroszkópiával való nyomon követése. A TUPS (8-thiouredopyrene 1,3,6-trisulfonate) molekula (Kotlyar és mtsi. 1997a) olyan ígéretes, könnyen hozzáférhető, kovalens fotoaktív redox jelölőt adott a kezünkbe, mellyel megnyílt a lehetősége nem-fotoszintetikus rendszerekben az elektrontranszfer folyamatok mérésének mind redukzív, mind oxidatív irányban. A TUPS komoly alternatívája a széleskörűen alkalmazott ruténium komplexeknek, mégpedig előnyös tulajdonságai miatt; ezek a hosszú élettartamú triplet gerjesztett állapota, az alacsony redoxpotenciálja és végül, de nem utolsósorban, a prekursorból való előállításának és a lizin vagy cisztein oldalláncokhoz való kötésének viszonylagos egyszerűsége. A TUPS bevezetőinek néhány publikációja után, melyekben a jelölő alkalmazásáról számoltak be fehérjék redukciójának kiváltására, célunk volt a TUPS fotokémiájának részletes tanulmányozása oldatban, illetve annak vizsgálata, hogy használható-e fényindukált fehérje-oxidációra is. Ehhez természetes választásnak adódott az egyetlen hemet, mint redox kofaktort tartalmazó, viszonylag egyszerű és igen részletesen ismert mitokondriális citokróm *c* fehérje.

A fehérjék dinamikája olyan, mindenhol felbukkanó tulajdonság, amely sok esetben szorosan összekapcsolódik a fehérjék működésével. A kinetikus abszorpciós spektroszkópia hasznos módszer lehet a fehérjedinamikával kapcsolatos folyamatok vizsgálatára minden olyan esetben, amikor a jelenségek gyors lézerrimpulzussal indíthatóak, és fellép valamilyen kromofór(ok) abszorpcióváltozása. Ilyen vizsgálatokra az egyik legalkalmasabb rendszer a p-coumarinsavat, mint kromofórt tartalmazó fotoaktív sárga fehérje (PYP). Ez a robusztus, intenzív színű molekula a G-fehérjékhez kapcsolt jelátvivő receptorok prototípusa. Fénnyel való gerjesztése nyomán három folyamat játszódik le: a kromofór izomerizációja, belső protontranszfer az E46 donorról a kromoforra és a

fehérje konformációjának megváltozása, mely a jeladó állapot kialakulásához vezet, és a fehérje részleges letekeredését eredményezi. Ez a reverzibilis, részleges kitekeredés várhatóan a fehérje víznek kitett felületének jelentős megnövekedésével jár együtt. A bizonyos anionok jelenlétében tapasztalható, a fehérjék szerkezeti stabilitását érintő Hofmeister hatás (HE) elméleti megalapozását jelentő elképzelés (Dér és mtsi. 2007) szerint a hidratált fehérjefelszín ilyen megváltozását a Hofmeister sók termodinamikailag befolyásolni tudják. Ennélfogva dinamikus tulajdonságai a PYP-et kiváló alanyává teszik a fehérjék stabilitását és reakciókinetikáját kutató kísérleti vizsgálatoknak. Munkánk második részében meg akartuk mutatni, hogy a HE hatékonyan felhasználható a fehérjék működésében alapvetően fontos, jelentős konformációváltozásokkal együtt járó folyamatok azonosításában.

Célkitűzés

- A TUPS fotokémiai jellemzése, oldatbeli elektrontranszfer folyamatainak részletes megismerése a fényindukált redukáló/oxidáló szerként való felhasználása céljából.

- A TUPS triplet gerjesztett állapota oxidatív tulajdonságainak vizsgálata és felhasználása fényindukált fehérjeoxidációs folyamatokban.

- A citokróm c hemje és a fehérje különböző felszíni pontjai közötti elektrontranszfer iránytól való függésének vizsgálata és a sebesség változásának mérése annak hatására, hogy genetikai módosítással változtatjuk a donor és akceptor közötti távolságot (a TUPS jelölő és a fehérje közötti összeköttetés hosszát).

- A PYP fotociklus intermedierjei abszorpciós spektrumának és időben változó koncentrációjának meghatározása az élettanhoz közel álló körülmények (mérsékelt magas pH, nagy sókoncentráció) között.

- Egy kellőképpen részletes fotociklus (reakció-) séma felállítása, mely helyesen írja le a PYP fotociklusát ilyen körülmények között. Az adatok globális illesztésének segítségével az intermediereket összekötő molekuláris sebességi állandók kiszámítása, és ezek függésének meghatározása a Hofmeister sóktól.

- Ily módon annak bizonyítása, hogy a Hofmeister effektus hatékonyan használható a fehérjék működését kísérő olyan alapvető lépések felderítésére és jellemzésére, melyek jelentős konformációváltozásokhoz kapcsolódnak.

Anyagok és módszerek

Rekombináns citokróm c kifejezése és tisztítása

Rekombináns, mutáns citokróm *c* variánsokat a BL21 *E. coli* törzsben állítottunk elő a pBAD24 plazmidról. A sejtek feltárása után a fehérjét a törmelékmentes felülűszöből nyertük ki, ammónium szulfát kisózással és Bio-Rex 70 gyantán történő ioncserélő kromatográfiával. A vad típusú citokrómot a Sigma-tól vásároltuk.

A TUPS-lizin és TUPS-cystamine származékok előállítása

A TUPS-lizin előállítását és tisztítását Prof. Alexander Kotlyar csoportja végezte publikált eljárás szerint (Kotlyar és mtsi. 1997a). A TUPS-cystamine molekulát a cystamine-nak 2-4-szeres mennyiségű IPTS prekuzorral való reakciójával állítottuk elő. A nem-reagált IPTS-t lizin hozzáadásával semlegesítettük az inkubáció végén.

A citokróm c jelölése

A citokróm *c* felületi lizinjeit (K8 és K39) IPTS-sel reagáltattuk, ezzel létrehozva a felületen a TUPS jelölőt. A különböző helyeken jelölt molekulákat HPLC ioncserélő kromatográfiával választottuk szét (Kotlyar és mtsi. 1997b). A citokróm *c* felületén helyspecifikus mutagenézissel bevezetett ciszteineket az SH-SS kicserélési reakció segítségével jelöltük a TUPS-cystamine prekuzorral.

UV-VIS sztatikus és kinetikus spektroszkópia

Egy Unicam UV4 spektrofotométert használtunk a minták ultraibolya és látható tartománybeli spektrumainak felvételére. A lézerflash-indukált kinetikus abszorpciós spektroszkópiai méréseket egy házi összeállítású optikai padon végeztük. Ennek sokcsatornás mérő egysége egy HR-320 Jobin-Yvon spektrográfhoz kapcsolt Andor ICCD vagy egy Princeton Instruments diódásor detektor volt. Egyhullámhosszas kinetikus méréshez ugyanezt a spektrográfot használtuk monokromátorként egy fotomultiplier detektorral, házi építésű erősítővel és számítógépes oszcilloszkóp kártyával. Egy 35W-os Xe-lámpa, digitális fényretesszel szaggatva szolgáltatva a fehér mérőfényt. A TUPS-tartalmú mintákat egy Nd:Yag lézer harmadik harmonikusával gerjesztettük 355 nm-nél, míg a PYP mintákat egy ugyanezzel a lézerrel gerjesztett OPO segítségével nyert 450 nm-es impulzussal.

Molekuladinamikai (MD) és elektrontranszfer-útvonal számítások

A MD számításokat a SYBYL 7.0 programcsomag (Tripos, Inc., St. Louis, MO) felhasználásával végeztük. Ezekhez a számításokhoz a Tripos erőteret használtuk és 80-as dielektromos állandót, a nem-kötő kölcsönhatások levágási határát pedig 30 Å-re állítottuk be. Az optimális

elektrontranszfer útvonalakat és az elektrontranszfer egyéb paramétereit a HARLEM program segítségével számoltuk (Kurnikov, 2001).

Matematikai kiértékelés

Az adatok statisztikai kiértékelését, a függvényillesztéseket és a matematikai modellezést (a spektrális-időbeli modellillesztést) MATLAB nyelven írt programokkal végeztük (MathworksTM). A PYP mérések modellillesztéséhez felhasznált kiinduló spektrumokat Joshi és mtsi. (2006) módszerével határoztuk meg. Az exponenciális sebességi állandók folytonos eloszlását, illetve a diszkrét sebességi állandókat a maximum-entrópia/nemnegatív legkisebb négyzetek módszer szerint végeztük, a MemExp-3.0 program felhasználásával (Steinbach és mtsi. 2002).

Eredmények és megvitatásuk

1. Vizsgáltuk a TUPS kölcsönhatásait oxidatív és redukív folyamatokban sokcsatornás tranziens abszorpciós spektroszkópia módszerével. A festék új reakcióját írtuk le, ahol annak gerjesztett triplet állapota megfelelő elektrondonor jelenlétében oxidánsként működik, és így előáll a TUPS negatív gyöke. Meghatároztuk a TUPS negatív gyök jellemző abszorpciós és differenciaspektrumát, ezzel kiegészítve a már ismert spektrumok (a triplet és a pozitív ion) körét. Anaerób és redox-semleges körülmények között, só jelenlétében, a TUPS gerjesztett triplet lecsengése során mért spektrumok mindhárom forma jelenlétét mutatták, ezzel igazolva, hogy a triplet gerjesztett állapotban lévő molekulák elektronikcserélődésre képesek. A kiszámolt koncentráció-profilok legkisebb négyzetes illesztésével arra kerestük a választ, hogy a lehetséges modellek közül melyik írja le helyesen a triplet lecsengésének és a pozitív és negatív ionok kialakulásának folyamatát az adott kísérleti körülmények között. A sikeres modell a következő lépéseket tartalmazta: a triplet spontán lecsengése, triplet-triplet annihiláció, tripletek közötti elektrontranszfer, melynek eredménye egy pozitív és egy negatív ion, illetve ennek fordítottja, a kialakult gyökök semlegesítése (rekombinációja) elektrontranszfer útján. (Kotlyar és mtsi. 2004)

2. A TUPS általunk leírt oxidatív tulajdonsága arra utalt, hogy olyan kovalens fényindukált jelölőként is használható lehet, mely biológiai rendszerekben nemcsak redukív, hanem oxidatív irányú elektrontranszfert is képes elindítani. Ezt a TUPS-nak redukált citokróm *c*-vel való komplexében igazoltuk, ahol a jelölő a 86. pozícióban lévő lizin oldallánchoz volt kötve. A minta fényvel való gerjesztése után megfigyeltük a triplet gyors lecsengését, és ezzel egyidejűleg a TUPS negatív gyök, valamint az oxidált hem megjelenését, nyilvánvaló módon elektrontranszfer eredményeképpen. A folyamat reverzibilisnek bizonyult. Az eredeti és a fordított elektrontranszfer részletes kinetikai analízise

megmutatta, hogy a hem redukciója a TUPS negatív ion által gyorsabb, mint az eredeti oxidációja a TUPS triplet által. Ez magyarázza az átmeneti termékek csak kismértékű felhalmozódását. (Kotlyar és mtsi. 2004)

3. Az elektrontranszfer távolságfüggésének vizsgálatához a TUPS-ot a ló szív citokróom *c* két lizin oldalláncához (K8 és K39) kapcsoltuk. Ezek távolsága a hemtől jelentősen eltér, ráadásul a hemhez képest a fehérje két átellenes felszínén helyezkednek el. A TUPS és a hem közötti fényindukált elektrontranszfer bonyolultabbnak bizonyult, mint azt az elektrontranszfer Marcus elmélete alapján jóslani lehetett. Míg (az adott jel/zaj viszony mellett) az előremenő elektrontranszfer egyetlen exponenciálissal volt közelíthető, a visszafelé irányuló elektrontranszfer határozottan nem. A multiexponenciális viselkedést a minta heterogenitásával lehetett értelmezni, és ezt később molekuladinamikai számítások is megerősítették. A MD eredmények azt mutatták, hogy a TUPS valószínűleg több, geometriailag különböző egyensúlyi helyzetet képes elfoglalni a fehérjéhez képest, ezeknek a hemtől való effektív távolsága eltérő lehet, és az elektron is különböző fehérjesűrűségeket „érezhet” az elektrontranszfer során. Továbbá, a kiszámított optimális elektrontranszfer útvonalak nem a kovalens összeköttetés mentén haladtak, hanem a festék és a fehérje felszíne között térbeli ugrással. Ezzel megmutattuk, hogy a kovalens összeköttetés hossza és az elektrontranszfer sebessége között ebben a rendszerben megszűnik a szoros kapcsolat. (Tenger és mtsi. 2005)

4. A PYP-en mért fényimpulzus-indukált differenciaspektrumokat kemometriai módszerek kombinálásával értékeltük ki, és öt átmenetre találtunk bizonyítékot, ami azt mutatja, hogy a PYP fotociklusában öt intermedier lép fel. Az adatok alapján két pR intermediert lehetett megkülönböztetni, ezek spektrálisan meglehetősen hasonlóak, de kinetikailag különböznek. A pB₁ spektrumban talált vörös oldali váll ezen intermedier lúgos formájának a jelenlétére utalt. Az abszorpciós spektrumok a fotociklus végén a kékbe tolódott intermedierek túlsúlyát mutatták, de azért a korai, vörösbe tolódott formák jelenléte is megfigyelhető volt. Ez azt bizonyítja, hogy ezen intermedierek között termikus egyensúly alakul ki. Végezetül, annak érdekében, hogy a kiinduló állapot biexponenciális visszatérését meg lehessen magyarázni, egy spektrálisan „csendes” pG₁ intermedier fellépését kellett feltételezni a fotociklus végén. Mindezen megfigyelések összegzéséként egy szekvenciális, általában reverzibilis fotociklus sémát javasoltunk, mely a pR₁, pR₂, pB₁, pB₂ és pG₁ intermediereket tartalmazta. Ezt a sémát használtuk aztán a különböző sók jelenlétében felvett adatok globális modellillesztése során (spektrális és kinetikus paraméterek egyidejű illesztésével), és eredményül megkaptuk a molekuláris átmenetek sebességi állandóit, továbbá az egyes intermedierek kinetikáját és abszorpciós spektrumát. (Khoroshyy és mtsi. 2013)

5. A kozmotróp és a kaotróp sók szisztematikus módon befolyásolták a fotociklus intermedierek kialakulását és lecsengését, valamint a köztük fellépő egyensúlyokat. Ez a szisztematikus hatás az anionok Hofmeister-sorát követte. A kaotrópok meghosszabbították, a kozmotrópok lerövidítették a teljes pB intermedier életidejét, a semleges NaCl-hez hasonlítva. A különböző körülmények között felvett adatok spektrális-időbeli modellillesztése részletes kvantitatív eredményeket szolgáltatott, lehetővé téve a fotociklus egyes molekuláris átmeneteinek esetében fellépő HE feltárását. Egyrészt, eredményeinkkel jól összhangban áll a $pB_1 \rightarrow pB_2$ átmenet során fellépő, a fehérje kinyílásával járó, irodalomból ismert jelentős konformációváltozás. Ugyanakkor egyéb átmeneteket is találtunk, melyek sebességének monoton növekedése a kozmotróp sóktól a kaotrópok felé haladva a fehérje kinyílására utal. Már a korai $pR_1 \rightarrow pR_2$ átmenet is így viselkedik, de meglepő módon messze a legnagyobb hatást a $pR_2 \rightarrow pB_1$ átmenet esetén tapasztaltuk. Ez egybeesik a kromofór protonációjával, és a kromofór „zsebének” hidratációjával. Dér és mtsi. (2007) szerint a reakciósebességekre kifejtett legnagyobb Hofmeister hatás akkor várható, amikor a fehérje vízzel érintkező felülete a leginkább változik. Ebből arra következtethetünk, hogy ezen lépés során a kromofór protonációja mellett olyan konformációváltozás történik, mely a fehérje hidrofób tartományainak a vizes fázissal való érintkezését növeli meg. Ez összhangban áll azzal az eredménnyel (Hoshihara és mtsi. 2008), hogy ugyanebben az időtartományban a PYP diffúziós állandója megnő, feltehetőleg az N-terminális fehérjedomén kitekeredése miatt. Érdekes az, hogy eredményeink szerint a pR_2 és pB_1 formák közötti szabadentalpia-különbség nem függ a jelenlevő kaotróp vagy kozmotróp sótól, hiszen az őket összekötő előremenő és fordított reakciók sebességi állandója párhuzamosan változik a sók függvényében. Tehát a pB_1 stabilizációja a pR_2 -höz képest valószínűleg a köztük lévő potenciálgát sztochasztikus fluktuációjának köszönhető a Hofmeister sók függvényében (Neagu és mtsi., 2001). Ugyanakkor a $pB_1 \leftrightarrow pB_2$ reakció során maga az egyensúly toldódik el a pB_2 javára, összhangban az irodalommal (Hoersch és mtsi., 2007). (Khoroshyy és mtsi. 2013)

6. A Hofmeister hatás részletes tanulmányozása a PYP fotociklus kinetikájára és átmeneti egyensúlyaira bebizonyította, hogy a HE alkalmas eszköz a nagy fehérjekonformáció-változások kimutatására és jellemzésére. A PYP konkrét esetében, irodalmi adatokra és saját eredményeinkre támaszkodva az alábbi szerkezeti „eseményeket” tudtuk valószínűsíteni ezen fehérje működése közben, a pR_1 intermedier kialakulásától kezdődően (Khoroshyy és mtsi. 2013):

$pR_1 \rightarrow pR_2$: konformációs relaxáció (kinyílás) az izomerizáció után
 $pR_2 \rightarrow pB_1$: nagy léptékű konformációs kinyílás, mely hidrofób oldalláncokat tesz a vizes fázis számára hozzáférhetővé (az N-terminális

domén kitekeredése, mely egybeesik a kromofór protonációjával)

$pB_1 \rightarrow pB_2$: további konformációs kinyílás (változások a PAS “magban” és a β -vázban)

$pB_2 \rightarrow pG_1$: konformációs feltekeredés (mely egybeesik a kromofór protonleadásával)

$pG_1 \rightarrow pG$: a kromofór reizomerizációja, a fehérje végső feltekeredése, ezzel a fotociklus lezárása.

Irodalom

Dér, A., Kelemen, L., Fábíán, L., Taneva, S.G., Fodor, E., Páli, T., Cupane, A., Cacace, M.G., and Ramsden, J.J. (2007) Interfacial water structure controls protein conformation. *J Phys Chem B*, 111, 5344-5350.

Hoersch, D., Otto, H., Joshi, C.P., Borucki, B., Cusanovich, M.A., and Heyn, M.P. (2007) Role of a conserved salt bridge between the PAS core and the N-terminal domain in the activation of the photoreceptor photoactive yellow protein. *Biophys J*, 93, 1687-99.

Hoshihara, Y., Imamoto, Y., Kataoka, M., Tokunaga, F., and Terazima, M. (2008) Conformational changes in the N-terminal region of photoactive yellow protein: a time-resolved diffusion study. *Biophys J*, 94, 2187-93.

Joshi, C.P., Borucki, B., Otto, H., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., and Heyn, M.P. (2006) Photocycle and photoreversal of photoactive yellow protein at alkaline pH: kinetics, intermediates, and equilibria. *Biochemistry*, 45, 7057-68.

Kotlyar, A.B., Borovok, N., and Hazani, M. (1997a) Use of thiouredopyrenetrisulfonate photochemistry for driving electron transfer reactions in aqueous solutions. *Biochemistry*, 36, 15823-7.

Kotlyar, A.B., Borovok, N., and Hazani, M. (1997b) Photoinduced electron transfer in singly labeled thiouredopyrenetrisulfonate cytochrome c derivatives.. *Biochemistry*, 36, 15828-33.

Kurnikov, I. (2001). HARLEM (HAMiltonians to Research Large Molecules). software package. <http://www.kurnikov.org>.

Neagu, A., Neagu, M., and Dér, A. (2001) Fluctuations and the Hofmeister effect. *Biophys J*, 81, 1285-1294.

Steinbach, P., Ionescu, R., and Matthews, C. (2002) Analysis of kinetics using a hybrid maximum-entropy/nonlinear-least-squares method: application to protein folding. *Biophys J*, 82, 2244-2255.

Publikációk listája

A disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó folyóiratcikkek:

Khoroshyy, P. Dér, A., and Zimányi, L. (2013) Effect of Hofmeister cosolutes on the photocycle of photoactive yellow protein at

moderately alkaline pH. J. Photochem. Photobiol. B, *in press* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.12.014>) (IF 2.413)

Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Leitgeb, B., Rákhely, G., Borovok, N., Kotlyar, A., Dolgikh D.A. and Zimányi L. (2005) Complex kinetics of the electron transfer between the photoactive redox label TUPS and the heme of cytochrome c. J. Chem. Inf. Mod. 45(6):1520-1526. (IF 4.675)

Kotlyar, A.B., Borovok, N., **Khoroshyy, P.**, Tenger, K. and Zimányi, L. (2004) Redox photochemistry of thiouredopyrenetrisulfonate. Photochem. Photobiol. 79(6):489-493 (IF 2.413)

További folyóiratcikkek:

Hajdu, K., Gergely, Cs., Martin, M., Cloitre, T., Zimányi, L., Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Palestino, A., Agarwal, V., Hernádi K., Németh, Z., and Nagy, L. (2012) Porous silicon/photosynthetic reaction center hybrid nanostructure. Langmuir 28(32):1866–11873 (IF 4.186)

Zimányi, L., **Khoroshyy, P.**, and Mair, T. (2010) A chemometric method to identify enzymatic reactions leading to the transition from glycolytic oscillations to waves. Physica D 239(11):866-872 (IF 1.594)

Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Rákhely, G. and Zimányi, L. (2010) Maturation of a eukaryotic cytochrome c in the cytoplasm of *Escherichia coli* without the assistance by a dedicated biogenesis apparatus. J. Bioenerg. Biomemb. 42:125-133 (IF 2.813)

Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Kovács, K.L., Zimányi, L. and Rákhely, G. (2007) Improved system for heterologous expression of cytochrome c mutants in *Escherichia coli*. Acta Biol. Hung. 58:23-35 (IF 0.59)

Mair, T., Zimányi, L., **Khoroshyy, P.**, Müller, A. and Müller, S.C. (2006) Analysis of the oscillatory kinetics of glycolytic intermediates in a yeast extract by FTIR spectroscopy. Biosystems 83:188-194 (IF 1.784)

A disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó konferencia-kivonatok:

Zimányi, L., **Khoroshyy, P.**, and Dér, A. (2011) Hofmeister salt effects on the photocycle dynamics of photoactive yellow protein. 7th International Conference for Biological Physics, San Diego, USA, p.116.

Khoroshyy, P., Dér, A. and Zimányi, L. (2011) Kinetic effect of Hofmeister ions on the photocycle of photoactive yellow protein. Eur. Biophys. J. 40(S1):208.

Khoroshyy, P., Tenger, K. and Zimányi, L. (2006) Intra- and interprotein photoinduced electron transfer in respiratory chain redox proteins. Biochim. Biophys. Acta 1757(14):187.

Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Leitgeb, B., Rákhely, G., Borovok, N., Kotlyar, A. and Zimányi, L. (2005) Complex electron transfer kinetics between the photoactive label TUPS and the heme of cytochrome c. Eur. Biophys. J. 34(6):665.

Tenger, K., Rákhely, G., **Khoroshyy, P.**, Leitgeb, B. és Zimányi, L. (2005) A fényindukált elektrontranszfer komplex kinetikája a fotoaktív redox jelölő, TUPS, és a citokróm c hem kofaktora között. A Magyar Biofizikai Társaság 22. Kongresszusa, Debrecen, 2005. június 26-29.

További konferencia-kivonatok:

Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Rákhely, G. and Zimányi, L. (2008) Heterologous overexpression of eukaryotic cytochrome c and cytochrome c heme lyase to study the mechanism of cytochrome c maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:S90.

Khoroshyy, P., Tenger, K. and Zimányi, L. (2008) Tuning the electron transfer rate by the redox potential of cytochrome c in complex with cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:S90.

Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Kovács, K.L., Rákhely, G. and Zimányi, L. (2007) Heterologous overexpression of eukaryotic cytochrome c and cytochrome c heme lyase in *Escherichia coli* for biophysical studies. Regional Biophysics Conference, Balatonfüred, Hungary, p.92.

Khoroshyy, P., Tenger, K. and Zimányi, L. (2007) Tuning of the electron transfer rate by the altered redox potential of heme c in cytochrome c and in its complex with cytochrome c oxidase. Regional Biophysics Conference, Balatonfüred, Hungary, p.114.

Khoroshyy, P., Zimányi, L., Mair, T., Müller, A. and Müller, S.C. (2005) Chemometric analysis of the oscillatory kinetics of glycolytic intermediates in a yeast extract from data measured by FTIR-spectroscopy. Regional Biophysics Meeting, Zrece, Slovenia, p.89.

Tenger, K., Rákhely, G., **Khoroshyy, P.** and Zimányi, L. (2005) Expression, purification and labeling of recombinant horse cytochrome c, and measurements of photoinduced intraprotein electron transfer. Regional Biophysics Meeting, Zrece, Slovenia, p.61.

Zimányi, L., Tenger, K., **Khoroshyy, P.**, Dolgikh, D., Siletsky, N., Borovok, N. and Kotlyar, A. (2004) Photoinduced electron transfer in cytochrome c and cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 13:158.

Khoroshyy, P., Tenger, K., Borovok, N., Kotlyar, A., Siletsky, S. and Zimányi, L. (2003) Electron Transfer Steps in the Complex of Cytochrome c and Cytochrome Oxidase. 10th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Szeged, Hungary, ISBN 963 482 614 8, p. 153.

Khoroshyy, P., Tenger, K., Borovok, N., Kotlyar, A. és Zimányi, L. (2003) Az elektrontranszfer lépései citokróm c és citokróm oxidáz komplexében. 33. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. május 20-23.