

Bakteriorodopszin intermedierek fotoelektromos válaszai

PhD értekezés tézisei

Tóth-Boconádi Rudolf

MTA Szegedi Biológiai Központ

Biofizikai Intézet

2004.

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Munkámban a *Halobacterium salinarum* (korábban *Halobacterium halobium*) sejtmembránjában lévő, fény hatására protont transzportáló fehérjével, a bakteriorodopszinnal (BR) foglalkoztam. Ezek a fehérjék a sejtmembránban kétdimenziós, hexagonális kristályrács rácspontjaiban hármassával helyezkednek el. A plazmamembrán csak BR molekulákat és lipideket tartalmazó részét bíbormembránnak (BM) nevezik. A bíbormembránban a BR-ek azonos orientációban vannak (karboxil végük a membrán citoplazmatikus oldalán van). A BM-ek a sejtől könnyen izolálhatók és az izolált membrándarabokban a BR-ek hosszú ideig (hónapokig) működőképesek maradnak szobahőmérsékleten is. A BM-ek szuszpenzióban (kb. 500 nm átmérőjű) sík korongok maradnak.

A BR hét (tengelyével a membrán síkjára nagyjából merőleges) transzmembrán hélixből áll. A G-hélixhez (annak 216-os lizin aminosavjához protonált Schiff-bázissal) egy retinál molekula kötődik. A retinál a hélixek által közrefogott központi üregben, a membrán felületével nagyjából párhuzamos irányban fekszik.

A retinál fotonabszorpciója után a BR egy ciklikus reakciósorozaton, ún. fotocikluson megy keresztül, aminek során a fehérje különböző konformációs állapotokba kerül. Ezeket a kvázistabil konformereket intermediereknek nevezik és K, L, M, N és O-val jelölik. Az intermedierek közötti átmenetek termikusan aktiváltak. Az intermedierek nemcsak konformációjukban, hanem színükben (abszorpciós spektrumukban) is különböznek egymástól. Ezt kihasználva a fotociklus kinetikája flash fotolízises módszerek segítségével tanulmányozható.

A fotociklus alatt játszódik le a proton fehérjén (membránon) keresztüli vektoriális transzportja. E töltésmozgás egy külső elektromos körben, megfelelően elhelyezett elektródákkal mérhető eltolódási fotoáramot indukál. Abból a célból, hogy makroszkopikusan is mérhető eltolódási áram jöjjön létre, egyidőben kell nagyszámú BR-t működésbe hozni és ezeknek a BR-eknek azonos orientációban kell lenniük. Az első követelmény egy nagyenergiájú, megfelelő hullámhosszúságú lézerimpulzussal kielégíthető. A második követelmény kielégítése céljából felhasználható a bíbormembránok azon tulajdonsága, hogy felületükre merőleges permanens elektromos dipólmomentummal rendelkeznek, így az eredetileg random orientációjú membránsuszpenzió kis ($10\text{-}20\text{V/cm}$) sztatikus elektromos térrel elektromosan aszimmetrikussá tehető. A membránok orientációja poliakrilamid gél polimerizálásával fixálható. A gél minta mérés technikai szempontból megkönnyíti az elektromos méréseket.

Orientált minta rövid fényimpulzusra adott eltolódási áramának segítségével tanulmányozható a protontranszport kinetikája.

A flash indukálta eltolódási áramnak (elektromos válasznak) két lényeges tulajdonsága van:

1. Kinetikája megegyezik a flash fotolízises kísérletekből (nyert) származó optikai jelek kinetikájával, tehát a fotociklus alatti optikai és elektromos történések között kinetikai korreláció van.
2. Időintegrálja nem nulla, ami a vektoriális töltéstranszportot tükrözi.

Az elektromos válasz vizsgálatából tehát információt kaphatunk a fotociklus kinetikájáról és a fehérje protonpumpáló képességéről.

Az irodalomból ismeretes, hogy a BR intermedierek fényérzékenyek. Fénnyel történő gerjesztésük során olyan fotoreakciók következnek be, amelyek nem egyeznek meg az illető intermedierek termikus reakcióival. A fotociklus ilyenkor más úton zárul. Eltolódási fotoáramok mérésével megállapították, hogy a K és M intermedierek fotogerjesztésével a BR protonpumpáló képessége megszűnik.

Munkámban célul tűztem ki az L, N és O intermedierek fotoreakcióit kísérő intramolekuláris töltésmozgások tanulmányozását az eltolódási fotoáramok segítségével, valamint annak meghatározását, hogyan függ a BR protonpumpáló képessége az előbbi formák fotogerjesztésétől.

II. MÓDSZEREK

Az intermedierek fotoreakcióit és ezekkel együtt a módosított fotociklusokat kettős flash-es kísérletek segítségével hoztam létre. E kísérletekben a BR molekulákat orientáltan tartalmazó gélmintákat két egymást követő flash-sel villantottam meg. Az első flash a fotociklus elindítását, míg a megfelelő hullámhosszúságú és késleltetésű második flash a fotociklus alatt tranziensen felhalmozódó intermedierek gerjesztését szolgálta. Egy ilyen kísérletben létrejött a tanulmányozott intermedierek fotoreakciója és a módosított fotociklus is. Mivel orientált mintát használtam, ezért az előbbi reakciókat kísérő intramolekuláris töltésmozgások a külső elektromos körben mérhető eltolódási áramot indukáltak. Ezt az áramot regisztráltam. A vizsgálatából nyert eredmények és következtetésem a III. részben találhatók.

A kísérletekhez olyan mintákat használtam, amelyekben a tanulmányozott intermedierek a fotociklus alatt kellő mértékben felszaporodnak. Vad típusú BR-t tartalmazó mintában, szobahőmérsékleten és neutrális pH-tartományban, flash gerjesztést követően a vizsgált intermedierek közül tranziensen csak az L forma akkumulálódik. Ilyen körülmények között az N és O intermedierek kialakulása és bomlása közel azonos sebességgel történik, ezért a fotociklus alatt tranziens felszaporodásuk nem figyelhető meg. Azonban a körülmények (hőmérséklet, pH) változtatásával vagy pontmutáció alkalmazásával ezeknek a formáknak a bomlása nehezíthető és a kívánt akkumulálódásuk elérhető.

Az N intermediér tanulmányozásához két gélmintát használtam. Az egyikben magas pH-jú (9,5) környezetben vad típusú BR-ek voltak, a másikban pedig semleges pH-jú környezetben T46V pontmutánsok.

Az O formával kapcsolatos kísérletekben szintén két gélmintát használtam. Az egyik alacsony pH-jú (4,5) környezetben vad típusú BR-eket tartalmazott, a másik pedig semleges pH-n L93A pontmutánsokat.

Az intermedierek mennyiségének fotociklus alatti változását abszorpciókinetikai mérések segítségével határoztam meg.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az eltolódási fotoáramok analízisével megállapítottam, hogy az L intermedier fotogerjesztésével a BR protonpumpáló képessége gyakorlatilag megszűnik, és az elektromos történések a μ s-os időtartományban relaxálódnak.
2. Abszorpciókinetikai és elektromos mérésekből megállapítottam, hogy
 - a.) a vad típusú BR N intermedierjének két alállapota van,
 - b.) a két alállapot közül csak az egyik fotogerjesztésével mérhető eltolódási áram,
 - c.) az N fotogerjesztése a BR protonpumpáló képességét nem változtatja meg, és
 - d.) az N forma fotoreakcióját ugyan intramolekuláris töltésmozgások kísérik, de eredő töltéstranzlokáció nem [1].
3. A T46V pontmutáns flash gerjesztésével megmutattam, hogy a mutáns protonpumpáló [1].

A mutáns N intermedierjének fotogerjesztésével kapott eredményeim megerősítik az előző pontbeli (2.) állításaimat [1].
4. Vad típusú BR O intermedierjének flash-sel és folytonos fénnel való gerjesztésével megállapítottam, hogy az O intermedier az alapállapothoz hasonlóan egy fényhajtotta protonpumpa, és hogy az O fotogerjesztésével a BR protonpumpáló képessége megnő [2].

5. Az L93A pontmutáns optikai és elektromos tanulmányozásával a következő eredményekre jutottam [3, 4, 5]:

- a.) Az irodalommal ellentétben azt találtam, hogy a mutáns fotociklusát kísérő optikai és elektromos történések között az egész fotociklus alatt korreláció van.
- b.) Az O intermedierek két (OI, OII) alállapota van.
- c.) Optikai módszerekkel tanulmányozva a mutáns fotociklus alatti protonleadását és -felvételét megállapítható, hogy a két O forma a fotociklusban egymást követően (sorban) helyezkedik el.
- d.) Kettős flash-es gerjesztési módszer alkalmazásával kimutattam, hogy a két O forma közül csak az OI fotoreakcióját kíséri mérhető eltolódási fotoáram.
- e.) A mutáns flash-sel és folytonos fénnel való gerjesztésével megállapítottam, hogy az O fotogerjesztése ebben az esetben is a fehérje protonpumpáló képességének a növekedését eredményezi.

IV. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ CIKKEK

1. R. Tóth-Boconádi, A. Szabó-Nagy, S.G. Taneva and L. Keszthelyi
Photoelectric response of the N intermediate of bacteriorhodopsin and its mutant T46V
FEBS Letters **459** (1999) 5-8
2. R. Tóth-Boconádi, S.G. Taneva and L. Keszthelyi
Photoexcitation of the O intermediate of bacteriorhodopsin and its mutant E204Q
Journal of Biological Physics and Chemistry **1** (2001) 58-63
3. R. Tóth-Boconádi, L. Keszthelyi and W. Stoeckenius
Late Events in the Photocycle of Bacteriorhodopsin Mutant L93A
Biophysical Journal **84** (2003) 3848-3856
4. R. Tóth-Boconádi, L. Keszthelyi and W. Stoeckenius
Photoexcitation of The O-intermediate in Bacteriorhodopsin Mutant L93A
Biophysical Journal **84** (2003) 3857-3863
5. R. Tóth-Boconádi and L. Keszthelyi
Photocurrent from illuminated O-intermediate in bacteriorhodopsin mutant L93A
Journal of Biological Physics and Chemistry (2004-ben elfogadva)

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Szeged, 2004. január 12.

1.) Dr. Keszthelyi Lajos

2.) Dr. Szabó-Nagy Andrea