

LUDMANN KRISZTINA ZELMA

**EGY PROTON PUMPA MŰKÖDÉSÉNEK
ENERGETIKÁJA ÉS TÖLTÉSMOZGÁSAI**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÉMAVEZETŐ

VÁRÓ GYÖRGY

A fizikai tudomány doktora

SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT

BIOFIZIKAI INTÉZET

2000

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezető:	3
A dolgozat célkitűzései:	7
1. Irodalmi áttekintés:	
1.1. A BR néhány általános tulajdonsága:	9
1.2. A BR fotociklusa köztes állapotainak és átmeneteinek leírása:	16
1.3. A BR fotociklusának elektromos jelekkel történő leírása:	21
1.4. Abszorpció kinetikai és elektromos jelekből kapott eredmények kombinálása: a BR energetikája:	25
2. Minták és mérési módszerek:	
2.1. Mintakészítés, mérési körülmények:	28
2.2. Optikai sokcsatornás analizátorral (OMA) mért jelek és azok kiértékelése:	30
2.3. Abszorpció kinetikai jelek mérése és kiértékelése:	32
2.4. Elektromos jelek mérése és kiértékelése:	36
3. Eredmények:	
3.1. Abszorpció kinetikai mérések:	38
3.2. Elektromos jel mérések:	52
3.3. Az M állapot újragerjesztése:	59
4. Az eredmények tárgyalása:	
4.1. Abszorpció kinetikai mérések:	68
4.2. Elektromos jel mérések:	76
4.3. Az M állapot újragerjesztése:	80
Összefoglalás:	85
Köszönetnyilvánítás:	89
Angol nyelvű összefoglaló:	92
Irodalom:	95

Mottó:

"ORANDO ET LABORANDO"

BEVEZETŐ

A sejt az élő szervezet alapegysége. Alapvető funkciói közé tartozik a munkavégzés, amely lehet: izomösszehúzódnás mechanikai munkája, töltések szállításakor végzett elektromos munka, féligáteresztő membránokon keresztül történő szállításkor végzett ozmótikus munka és új anyagok szintézisekor végzett kémiai munka. Ahhoz, hogy a különböző sejtek képesek legyenek az ilyen típusú munkákat elvégezni, szükségük van energiára és olyan mechanizmusokra, amelyekkel az energia a megfelelő módon átalakítható. A legtöbb esetben az energia ATP lebontásból vagy szubsztrát oxidációból származik.

Egyes élő sejtek azon képességét, hogy a fényenergiát, mint további energiaforrást, a metabolizmusához fel tudja használni, több független rendszer is "kifejlesztette" (Woese 1987). Az eubaktériumban ez a klasszikus fotoszintézis, ami klorofill pigmenteken és redox-kémián alapul, az *Archaeobaktériumban* (Dencher 1983) pedig ez egy kromoprotein rendszer, ami retinált (*Vitamin-A aldehidet*) tartalmaz (mint kromofór) és képes fény hatására

ionokat szállítani a sejtmembránon keresztül. Az egyik ilyen baktérium, ami ezt a fényátalakítást elvégzi, az extrém halofil, a *Halobacterium salinarum*.

A baktérium sejtmembránjában több fényérzékeny fehérje van. Ezek közül a *bakteriorodopszin* (BR) egy fény hajtotta proton pumpa (Lozier és mtsai. 1975). A szubsztráthoz kötött energiák vezérelte kémiai reakciókhoz (ion mozgó ATPáz, NADH/NADP transzhydrogenáz) és a redox reakciókon alapuló fényvezérelt elektron transzfer folyamatokhoz képest (citokróm oxidáz, citokróm bc komplex), a bakteriorodopszinban a proton átvitel pK_a változások által vezérelt, melyet a retinál fény hatására bekövetkező izomerizációja indít el. A retinál izomerizációját követő reakciók termikus relaxáció folytán jönnek létre. A fényenergia elektrokémiai energiává alakul, protongrádiens formájában, amit a sejt ATP szintézishez használ (Racker és Stoeckenius 1974; Oesterhelt 1975; Hartmann és Oesterhelt 1977; Helgerson és Stoeckenius 1985; Mukohata és mtsai. 1986). A proton pumpálási folyamatnak és ATP szintézisnek ez a fajta összekapcsolódása a Mitchell féle kemiozmótikus elméletet támasztja alá (Mitchell 1961).

A proton pumpálás mechanizmusa ma már nagyrészt ismert és a szerkezet-funkció kapcsolata is nagyjából megoldottnak tekinthető. A jelen dolgozatban leírásra kerül, hogy a bakteriorodopszin kromofórja a fény elnyelése után milyen módon adja át a kapott energiát a fehérjének és hogyan alakul át ez az energia proton pumpálást mozgó erővé (Ludmann és mtsai. 1998a). A

dolgozatot alkotó cikkekben az energetika mellett, a proton pumpálás folyamata során jelentkező proton mozgásából és a különböző töltött aminosav oldalláncok mozgásából eredő, globális töltésmozgások leírására is sor kerül (**Ludmann és mtsai. 1998b**). Ezeket a munkákat a, talán legvitatottabb köztes állapot spektroszkópiailag megkülönböztethetetlen al-állapotai létének bizonyítása egészíti ki, egy olyan problémakör, amelynek eredményei szervesen kapcsolódnak az eddigi kutatási eredményekhez (**Ludmann és mtsai. 1999**).

Az általunk használt módszer jól felhasználható más jelenségek, bakteriorodopszinon történő, tanulmányozására is, mint például: a víz szerepének tanulmányozása (**Ganea és mtsai. 1997**) és a különböző kémiai adalékanyagoknak a fotociklusra kifejtett hatásának tanulmányozása (**Batori-Tartsi és mtsai. 1999**).

Tovább általánosítva, ezek a módszerek más fehérjék tanulmányozására is alkalmasak. Például egy klorid ion pumpáló fehérje a *pharaonis* halorodopszin (**Ludmann és mtsai. 2000**) sőt még messzebb menve a fotoszintetikus reakció centrum (**Rinyu és mtsai. 2000**) tanulmányozására.

RÖVIDÍTÉSEK:

BR – bakteriorodopszin

PM – bíbormembrán (purple membrane)

D85N, D96N, stb. – a bakteriorodopszin pontmutánsai

OMA – optikai sokcsatornás analizátor (optical multichannel analyzer)

K,L,M,N,O – a bakteriorodopszin fotociklusa köztes állapotainak jelölése

SVD – sajátértékekre való bontás (singular value decomposition)

A DOLGOZAT CÉLKITŰZÉSEI

1. A bakteriorodopszin fotociklusának leírására az eddigi munkákban több modellt is felhasználtak. A modellek próbálták lépésről lépésre híven tükrözni a proton szállítás mechanizmusát. A fotociklus köztes állapotai spektrálisan és időben erősen átfedik egymást, így minden időpillanatban több köztes állapot van egyidejűleg jelen, ami nagyban megnehezíti a valóságban lezajló lépések pontos leírását. A széles hőmérséklet és pH tartományban mért jelek feldolgozásakor célunk volt annak a legmegfelelőbb modellnek a kiválasztása amely alkalmas a történések egységes leírására és érvényes a teljes tanulmányozott pH és hőmérséklet intervallumokra.
2. Az abszorpció kinetikai jelek hőmérsékletfüggésének mérése lehetővé tette a fehérje termodinamikai paramétereinek: az aktivációs entalpia, entrópia és szabadenergia kiszámítását. Ennek értelmében célul tűztük ki a rendszer energetikájának megrajzolását és tárgyalását, melyből kitűnik, hogy a retinál által abszorbeált foton energiája hogyan kerül át a fehérjére és hogyan alakul át proton szállítást mozgóató erővé.
3. Az elektromos jelek hasonló körülmények között való mérése kiegészítette az eddigi kutatási eredményeket és még pontosabban megrajzolta a

töltésmozgások és a BR fotociklusának köztes állapotai közötti szoros összefüggést. Célul tűztük ki annak a bizonyítását, hogy az abszorpció kinetikai jeleket leginkább illesztő szekvenciális modell alkalmas az elektromos jelek illesztésére extrém pH és hőmérsékleti értékek esetében is.

4. Célunk volt az elektromos és abszorpció kinetikai jelek egyidejű illesztése és az egyes köztes állapotokhoz tartozó elektrogenicitások kiszámítása.
5. Az elektrogenicitások széles pH tartományban való ábrázolása és a köztes állapotok közötti átmenetekhez tartozó töltésmozdulások még pontosabb leírása volt az egyik fontos feladat.
6. A proton extracelluláris térbe kerülése és a fehérjének a citoplazmatikus oldara történő kinyílása kulcsfontosságú lépés a BR fotociklusában. Ehhez a lépéshez tartozik a fotociklus M köztes állapota, amelynek két spektroszkópiailag megkülönböztethetetlen formája van. Az M köztes állapot, a többi köztes állapothoz képest, kék felé tolódott abszorpciós maximummal rendelkezik és laboratóriumi berendezéseink segítségével könnyen tanulmányozható. Célul tűztük ki az M köztes állapot újragépesztési módszerrel történő tanulmányozását és alállapotainak megkülönböztetését.
7. A fehérje konformáció változásának feltérképezésére és jobb megértésére abszorpció kinetikai és elektromos jel mérések elvégzését tűztük ki célul mutáns bakteriorodopszin mintákon.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A BR néhány általános tulajdonsága

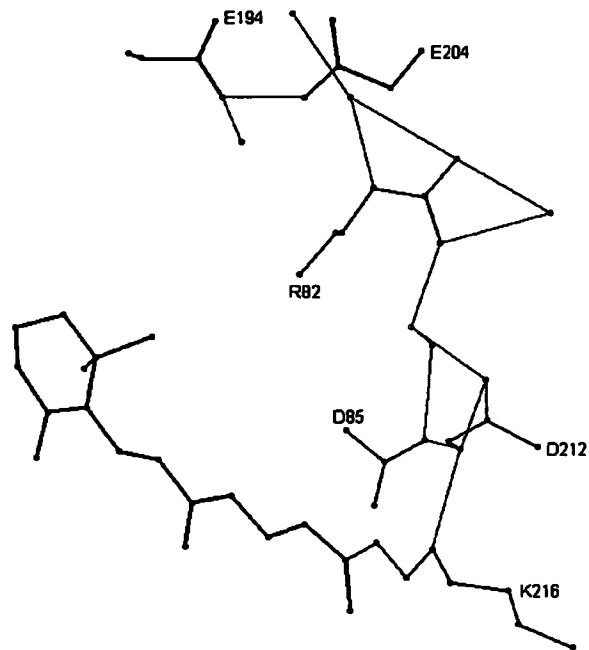
Anaerób körülmények között a *Halobacterium salinarum* sejtmembránja kétdimenziós hexagonális kristályrácsba elhelyezett bakteriorodopszin trimerek terjedelmes foltjait termeli, ezeket bíbormembránoknak nevezzük (Lanyi és Váró 1995). A bíbormembránok vastagsága 4.9 nm, átmérője 0.5 μm , 75%-ban fehérjét (BR-t) és 25%-ban lipidet tartalmaznak (Blaurock és Stoeckenius 1971). A bíbormembránok könnyen, tiszta állapotban kivonhatók a standard izolálási technikák segítségével. Izolálás után a membránok nem képeznek vezikulákat, hanem egy többé-kevésbé lapos, merev lapként megmaradnak. Hasonlóan más biológiai membránhoz, a bíbormembránok is nettó negatív felületi töltéssel rendelkeznek, kb. -0.002 töltés/ Å^2 , ami 2 elektron/BR-nek felel meg. A felületi negatív töltés a BR savas aminosavainak és a lipideknek tulajdonítható (Kates és mtsai. 1982). Az aszimmetrikus felületi töltéseloszlás folytán létező permanens dipólmomentumot $\sim 10^7$ Debye nagyságúra becsülték (Keszthelyi és Ormos 1980; Barabás és mtsai. 1983; Kimura és mtsai. 1984).

A 26 kDa molekulásúlyú fehérje egyetlen, 248 aminosavat tartalmazó polipeptid láncból áll, amely a membránt 7, a membránra majdnem



1.1. ábra. A bakteriorodopszin 0.155 nm feloldással készült szerkezeti képe (Luecke és mtsai. 1999). A fehérje körül a lipid csoportok láthatók. A fehérjét alkotó 7 α -hélixet szalag ábrázolásban jelenítettük meg.

merőleges α -hélixben szeli át (1.1. ábra). A prosztetikus kromofór csoport *all-trans* retinál, ami kovalensen, protonált Schiff bázison keresztül kapcsolódik a 216-os Lizin ϵ -amino csoportjához. A retinál a membrán felületével 20° -os szöget zár be (Bogomolni és mtsai. 1977, Barabás és mtsai. 1983, Harbison és mtsai. 1985).

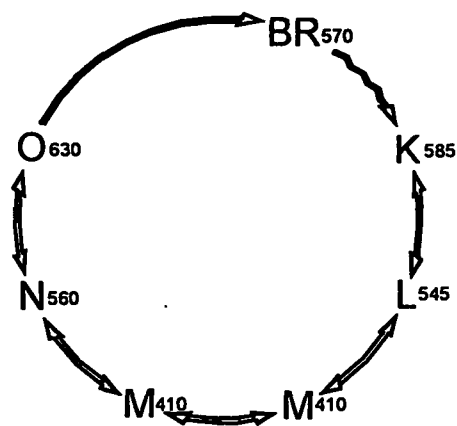


1.2. ábra. A bakteriorodopszin bíbor színét adó retinál és az extracelluláris térbe protont vezető, hidrogén kötéses hálózat felnagyított képe a 0.155 nm felbontással készült szerkezet alapján (Luecke és mtsai. 1999).

In vitro körülmények között az *all-trans* retinál protonált Schiff bázisa 440 nm-en abszorbeál. A fehérjéhez való kötődése az abszorpciós maximumot 570 nm-re tolja, ami a Schiff-bázis környezetében lévő töltött oldalláncok által keltett elektromos térnek tulajdonítható (Kakitani és mtsai. 1985; Nakanishi és mtsai. 1980; Warshel 1978). Ez az opszin-eltolódás a fehérje bíbor

színét eredményezi. A Schiff bázis pozitív töltését negatív töltéskomplex ellensúlyozza egy hidrogénhidás elrendeződés segítségével (1.2. ábra) (De Groot és mtsai. 1989; De Groot és mtsai. 1990). Ez az elrendeződés az Asp 85, Asp 212 és Arg 82 aminosavakat valamint kötött vízmolekulákat tartalmaz (Hildebrandt és Stockburger 1984). A létező coulomb kölcsönhatás az Asp 85, Asp 212 és Arg 82 aminosavak pontmutánsain végzett kísérletekből derül ki és a kromofór abszorpciós maximumának eltolódásaiban, a Schiff bázis pK_a változásaiban és a deprotonálódás megváltozott kinetikájában nyilvánul meg (Mogi és mtsai. 1988; Subramaniam és mtsai. 1990; Otto és mtsai. 1990; Miercke és mtsai. 1991; Zimányi és mtsai. 1992a; Brown és mtsai. 1993; Turner és mtsai. 1993; Needleman és mtsai. 1991).

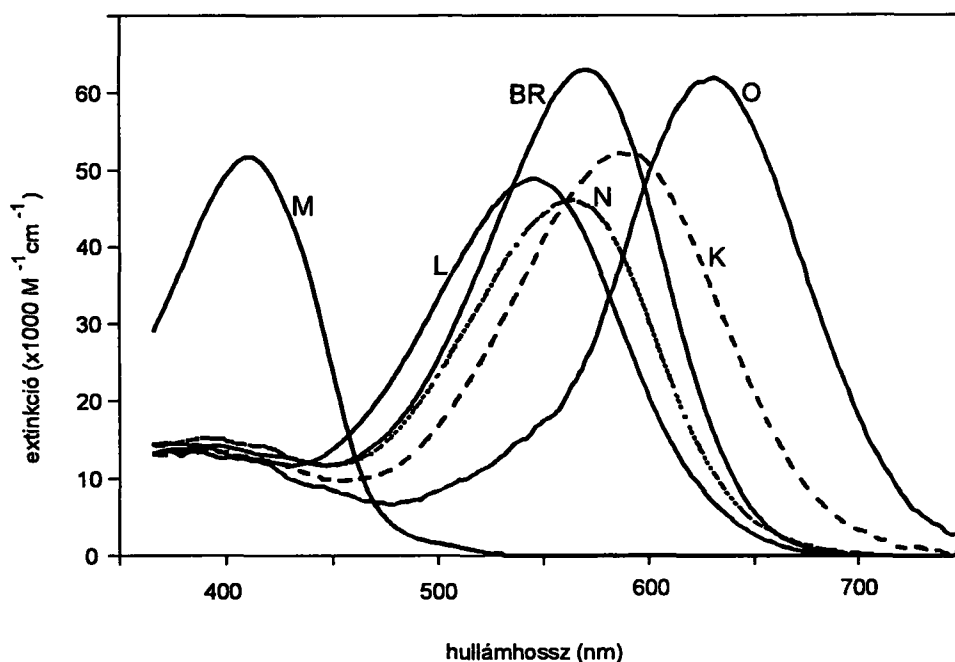
A bakteriorodopszin háromdimenziós szerkezete, több próbálkozás után (Henderson és mtsai. 1990; Grigorieff és mtsai. 1996; Kimura és mtsai. 1997; Pebay-Peyroula és mtsai. 1997; Luecke és mtsai. 1998), ma már 0.155 nm felbontásban ismert, ez lehetővé tette az oldalláncok feltérképezését a fehérje belsejében, valamint az extracelluláris csatornában helyet foglaló vízmolekulák helyének meghatározását is (1.2. ábra) (Luecke és mtsai. 1999). Lehetőség nyílt, hogy a fehérje körüli eddig nem látható lipid csoportok helyét is meghatározzák (lásd az 1.1. ábrát) (Luecke és mtsai. 1999). A bakteriorodopszin szerkezetében két proton vezető csatornát feltételeznek, melyeket a retinál kromofór választ el a



1.3. ábra. A bakteriorodopszin fotociklusának vázlatos modellje a köztes állapotok és azok abszorpciós maximumának feltüntetésével.

membrán belsejében (Nagle és Morowitz 1978). Az egyik az extracelluláris oldalon levő csatorna, amely több töltött aminosavat tartalmaz. A másik a citoplazmatikus csatorna, amely főként hidrofób gyököket tartalmaz. A bakteriorodopszin mutánsokon végzett kísérletek segítségével azonosították azokat az aminosavakat, amelyek a protonvezetés folyamatában közvetlenül szerepet játszanak. Ezek az Asp 85, Asp 212 és Arg 82, Glu 194, Glu 204 aminosav csoportok (1.2. ábra) az extracelluláris csatornában, és az Asp 96 aminosav a citoplazmatikus csatornában

(Mogi és mtsai. 1988; Tittor és mtsai. 1989; Butt és mtsai. 1989; Thorgeirsson és mtsai. 1991).



1.4. ábra. A bakteriorodopszin fotociklusa köztes állapotainak differencia spektruma a Gergely és mtsai. (1997) alapján.

A fehérje két állapotban létezhet: fényadaptált állapotban (BR_{fa}) és sötétadaptált állapotban (BR_{sa}). A fényadaptált állapot 100%-ban *all-trans*, *15-anti* retinált, míg a sötét adaptált állapot, szobahőmérsékleten, közel 1:1 arányban a *13-cis*, *15-syn* és *all-trans*, *15-anti* retinálók keverékét tartalmazza, melyek

termikus egyensúlyban vannak egymással. Sötétadaptált BR-ben fénygerjesztés folytán a *13-cis* retinált tartalmazó fehérje egyszerű fotocikluson megy át, amely két köztes állapotot tartalmaz és nem szállít protont a membránon keresztül (Kalisky és mtsai. 1977; Dencher 1983; Hofrichter és mtsai. 1989; Lozier és mtsai. 1992; Gergely és mtsai. 1994). Ezzel szemben a fényadaptált BR *all-trans* retinálja fénygerjesztés folytán több köztes állapoton megy keresztül és ezzel egyidejűleg egy protont szállít a citoplazmatikus oldalról az extracelluláris térbe (Ebrey 1993; Krebs és Khorana 1993; Lanyi és Váró 1995; Haupts és mtsai. 1997). Egy ciklus időtartama szobahőmérsékleten, pH 7 értéken kb. 10 ms.

Semleges pH-n és szobahőmérsékleten a fényadaptált BR fotociklusának (1.3. ábra) az alábbi, spektrálisan megkülönböztethető, köztes állapotai vannak: K, L, M, N, O, BR (Lozier és mtsai. 1975). A köztes állapotok mindegyikének jól meghatározott abszorpciós maximuma van (1.4. ábra) (Gergely és mtsai. 1997). A BR alapállapot 570 nm abszorpciójához viszonyítva, a K és O köztes állapotoknak vörös felé tolódott, az L, M és N köztes állapotoknak kék felé tolódott maximuma van. Az M állapot kék felé tolódott maximuma a deprotonált Schiff bázis jelenlétére utal. Léteznek ezeken az állapotokon belül alállapotok, pl. L₁ és L₂, M₁ és M₂, N₁ és N₂ (Váró és Lanyi 1990; Cao és mtsai. 1993; Gergely és mtsai. 1993; Zimányi és mtsai. 1993; Chizhov és mtsai. 1996), amelyek jelenléte arra utal, hogy a transzport folyamat összetett.

A fotociklus köztes állapotai közötti reakciókat spektrális változások kísérik mind a látható mind az infravörös tartományban. Ezek a változások szorosan kapcsolódnak a proton leadási és proton felvételi lépésekhez a membrán két oldalán. Ezt a fehérjéhez kovalensen kötött vagy a mérőoldathoz kevert pH indikátorokkal végzett kísérletek bizonyítják (Grzesiek és Dencher 1986; Heberle és Dencher 1992; Drachev és mtsai. 1984; Drachev és mtsai. 1987; Scherrer és mtsai. 1994; Alexiev és mtsai. 1994; Zimányi és mtsai. 1992a; Nagle és Morowitz 1978; Chang és mtsai. 1985; Druckmann és mtsai. 1985; Dencher és mtsai. 1983; Sherman és Caplan 1978; Steinem és mtsai. 1997).

1.2. A BR fotociklusa köztes állapotainak és átmeneteinek leírása

A fotociklus két első lépése közül a $K \rightarrow L$, a μs időtartományban lezajló átmenethez, a Schiff bázison történő töltésszétválasztás tartozik (Marcus és Lewis 1978; Warshel és Ottolenghi 1979; Birge 1981; Mathies és mtsai. 1991). Az $L \rightarrow M$ (50 μs alatt létrejövő) lépésben a retinál Schiff bázisának protonja az eredetileg negatívan töltött Asp 85-re kerül (Braiman és mtsai. 1988; Butt és mtsai. 1989; Gerwert és mtsai. 1990; Souvignier és Gerwert 1992; Braiman és mtsai. 1991; Hessling és mtsai. 1993). Ez egyúttal a proton transzport első lépése.

Ezzel együtt az extracelluláris oldalon lévő protonleadó csoporttól egy proton az extracelluláris térbe kerül. Az M utáni lépések közül az $M \rightarrow N$ (1 ms) átmenethez a Schiff bázisnak az eredetileg semleges Asp 96-ról való reprotonálódása tartozik (Butt és mtsai. 1989; Braiman és mtsai. 1991). Az $N \rightarrow O$ (a ms időtartományban lezajló) átmenet során a retinál újra *all-trans* konfigurációba izomerizálódik. Az O állapot életideje alatt a Asp 85 átadja protonját az extracelluláris oldalon levő protonleadó csoportnak, a retinál eredeti konfigurációja és a fehérje környezete pedig az $O \rightarrow BR$ (10 ms) lépésben áll vissza (Lozier és mtsai. 1975).

A K és L állapotok spektrumának meghatározására kezdetben alacsony hőmérsékletű spektroszkópiát használtak (Becher és mtsai. 1978; Iwasa és mtsai. 1980; Hurley és mtsai. 1978; Hurley és Ebrey 1978). Ezek a körülbelül 100 K alatti hőmérsékleten végzett kísérletek, 50-60%-os glicerin jelenlétében zajlanak, hogy a hűtéskor átlátszó üvegszerű minta jöjjön létre. Megvilágítás folytán, különböző hullámhosszakon a BR és K köztes állapotok fotostacionárius keveréke jelenik meg. A K köztes állapot után következő állapotok a minta fokozatos felmelegítésével érhetők el (Becher és mtsai. 1978). A $BR \rightarrow K$ reakció kvantum hatásfoka 0.65, a $K \rightarrow BR$ reakcióé pedig 1.0 (Govindjee és mtsai. 1990; Tittor és Oesterhelt 1990; Xie 1990).

Szobahőmérsékleten a $K \rightarrow L$ átmenetet 600 nm feletti hullámhosszknál vagy az infravörös tartományban lehet tanulmányozni. Az



átmenet két exponenciálissal, 1 μ s és 100 μ s időállandókkal és 9:1 amplitúdó aránnyal írható le (Váró és Lanyi 1991a; Váró és Lanyi 1991b). A kétfázisú kinetika tranziens egyensúly kialakulásaként megmagyarázható, amely a K és L állapotok között jön létre és összhangban van azzal a ténnyel, hogy a K állapot teljes lecsengése megegyezik (többé-kevésbé) az L állapot lecsengésével (Váró és Lanyi 1991a; Sasaki és mtsai. 1993).

Az L állapot lecsengése és az M kialakulása különösképpen összetett. A jó jel-zaj viszonyú mérőrendszer három komponenst azonosít az M kialakulásában (Váró és Lanyi 1991a; Heberle és Dencher 1992; Alexiev és mtsai. 1994). A körülbelüli időállandók és amplitúdók alakulása a következő: 1-2 μ s (kb. 10%), 35 μ s (kb. 25%) és 150 μ s (kb. 65%). Egy negyedik komponenst is jeleztek az M kialakulásában (Heberle és mtsai. 1993). pH 7-nél az L koncentrációja az M koncentrációjának 0.5 %-ra csökken (1 ms-nál) és körülbelül ugyanekkor az M koncentrációja eléri a maximumot (Váró és Lanyi 1991a). Magas pH értékeknél az M kialakulása egy nagyságrenddel gyorsabbá válik (Zimányi és mtsai. 1992b; Hanamoto és mtsai. 1984; Bitting és mtsai. 1990; Váró és Lanyi 1990; Balashov és mtsai. 1991).

Az M állapot életideje alatti konformációs változásokat elektron- és Röntgen-diffrakciós kísérletekből határozták meg (Koch és mtsai. 1991; Nakasako és mtsai. 1991; Subramaniam és mtsai. 1993; Han és mtsai. 1994; Vonck és mtsai.

1994). Gyakorlatilag két, spektroszkópiailag megkülönböztethetetlen M állapotról számolnak be, melyek közül az egyikben a Schiff bázis az extracelluláris tér felől, a másikban pedig a citoplazmatikus tér felől hozzáférhető (Váró és Lanyi 1991a; Zimányi és mtsai. 1992a; Druckmann és mtsai. 1992; Kataoka és mtsai. 1994; Hessling és mtsai. 1997). Az M állapot két állapotának tanulmányozására BR mutánsokon végzett kísérletek szolgáltatnak figyelemreméltó eredményeket (Holz és mtsai. 1989; Gergely és mtsai. 1993). Ehhez járultak később az újragerjesztéses módszerrel készült mérések, kihasználva a köztes állapotok fényaktivitását (Balashov és mtsai. 1995).

Az M állapot lecsengése szintén több exponenciálist tartalmaz (Eisfeld és mtsai. 1993; Hender és mtsai. 1994; Tokaji és Dancsházy 1992; Mukhopadhyay és mtsai. 1994). A Schiff bázis reprotonálódásával, az M állapot után, a fehérje az N állapotba megy át (Eisfeld és mtsai. 1993; Hender és mtsai. 1994; Tokaji és Dancsházy 1992; Mukhopadhyay és mtsai. 1994). Az N állapot protonált Schiff bázist tartalmaz, a retinál még mindig *13-cis*, *15-anti* konfigurációban van. Az N és O állapotok kinetikai összefüggése nem tisztázott, bár az O állapotot, mint az N követőjét tekintik (Chernavskii és mtsai. 1989).

A különböző hullámhosszakon mért abszorpcióváltozások időfüggésének globális analízise felfedett néhányat a fentebb említett paraméterekből, de nem képes egyetlen, jól meghatározott fotociklus modellt

igazolni (Lozier és mtsai. 1992; Souvignier és Gerwert 1992; Nagle és mtsai. 1982; Nagle és mtsai. 1995; Maurer és mtsai. 1987; Nagle 1991; Müller és mtsai. 1991). Bár a fotociklus köztes állapotai látszólag egymásután jelennek meg és csengenek le, mégsem jöhet szóba egyetlen, a köztes állapotokat egyirányú reakciókkal összekötő szekvenciális modell. Az irodalomban, a többkomponensű felfutásokat és lecsengéseket figyelembe vevő fotociklus modellek között találunk párhuzamos fotociklusokat feltételező modellt (Hanamoto és mtsai. 1984; Balashov és mtsai. 1991; Dancsházy és mtsai. 1988; Birge 1990; Drachev és mtsai. 1992; Eisfeld és Stockburger 1992; Pusch és mtsai. 1992), elágazásokat tartalmazó fotociklus modellt (Drachev és mtsai. 1992; Sherman és mtsai. 1979; Beach és Fager 1985), reverzibilis átmeneteket feltételező, elágazásokat nem tartalmazó fotociklus modellt (Gerwert és mtsai. 1990; Váró és Lanyi 1991a; Váró és Lanyi 1991b; Váró és Lanyi 1990; Váró és Lanyi 1990; Ames és Mathies 1990; Zimányi és Lanyi 1993), valamint kétfotonos ciklust leíró modellt, amely a lassabban lecsengő M formát az N köztes állapot fotoreakciójaként képződött formaként veszi figyelembe (Kouyama és mtsai. 1988; Fukuda és Kouyama 1992).

Egyedül a spektroszkópiai adatok nem elegendőek ahhoz, hogy dönteni lehessen az egyes modellek között, a kinetika tisztázásához szükség van további és egymástól független adatokra.

1.3. A BR fotociklusának elektromos jelekkel történő leírása

A fotoelektromos mérések szempontjából a membránstruktúra aszimmetriája és a membrán két oldalán levő felületi töltéssűrűség különbség alapvető fontossággal bír (Hayward és mtsai. 1978). Ez a töltéssűrűség különbség felhasználható arra, hogy orientált minták készüljenek a BR lipid kettős rétegbe ágyazásával (Dancsházy és Karvaly 1976; Bamberg és mtsai. 1981; Butt és mtsai. 1989), a bíbormembránok lipid impregnált szűrőre (Drachev és mtsai. 1984), vagy vékony teflon rétegre (Holz és mtsai. 1988) orientált adszorpciójával. Ezek a mérési technikák nagyon érzékenyek az elektromos jel mérésekre, de hibájuk, mivel a membránok egyréteget képeznek a hordozó felületen, hogy a mintáknak nagyon kicsi a sűrűsége és az abszorpció kinetikai jelek mérése nehézkes. További nehézséget jelent, hogy a bíbormembránok két oldala a mérőoldatban nem közelíthető meg egyenlő mértékben, vagyis a mérési körülmények nem azonosak a teljes mintára nézve. A víz szerepének tanulmányozásakor készültek olyan orientált, úgynevezett száraz minták, ahol a bíbor membránok egy vezető üveg felületére kerültek elektroforetikusan (Váró 1981; Váró és Keszthelyi 1983; Kononenko és mtsai. 1986; Lewis és mtsai. 1996). Ezeken a mintákon már lehetőség nyílt mind abszorpció kinetikai mind elektromos jelek mérésére és a

minták évekig működőképesek, de egy ilyen rendszer távol áll az élő sejt körülményeitől.

A bíbormembrán szuszpenziók külső elektromos tér alkalmazásával történő orientálása, a membránok permanens dipólmomentumát kihasználva, sikeres próbálkozásnak bizonyult (Keszthelyi és Ormos 1983; Keszthelyi és Ormos 1989). Az orientáció akrilamid gélbe rögzíthető, és az így készült minták esetében már nem lépnek föl az eddig tárgyalt hibák (Dér és mtsai. 1985). Probléma csak magas sókoncentrációknál lép föl, amikor a minta ellenállása kicsi és a jel-zaj viszony értéke csökken (Dér és mtsai. 1988; Dér és mtsai. 1992; Gergely és mtsai. 1993). Az elektromos jelek értelmezésére született első néhány próbálkozás szoros összefüggést mutatott az elektromos jel összetevői és a fotociklus köztes állapotai között (Keszthelyi és Ormos 1980; Keszthelyi és Ormos 1983). Az elektromos jelek pH- és só koncentráció függését tanulmányozták (Ormos és mtsai. 1985; Liu 1990; Liu és mtsai. 1990). Megfigyelték, hogy néhány puffer alacsony koncentrációkon az elektromos jel előjelét megváltoztatja (Tóth-Boconádi és mtsai. 1986; Dér és mtsai. 1988; Liu és mtsai. 1991).

Abból a megfigyelésből kiindulva, hogy egyetlen proton mozgásáról van szó és a fehérje dielektromos állandója állandó, a proton által megtett távolságot minden köztes állapot esetén kiszámították (Keszthelyi és Ormos 1980). Ez a leírás kiegészítésre szorult, mivel a fotociklus folyamán nemcsak

a szállított proton, de a töltött aminosavak és azok oldalláncai is mozoghatnak, és nincs információ a fehérje lokális dielektromos állandójáról. Elektromos és mágneses tér együttes alkalmazásával sikerült olyan gél mintákat előállítani, amelyekben a bábormembránok orientációs foka, és ezzel együtt a minta anizotrópiájának foka, jelentősen nőtt (Dér és mtsai. 1995). Ezzel a megnövelt anizotrópiájú mintával sikerült az intramolekuláris töltésmozgások háromdimenziós követése, polarizált fénnel való gerjesztés folytán (Dér és Ormos 1995). Egy általánosabb leírása a töltésmozgásoknak a köztes állapotok relatív elektrogenicitása, mint a dipólnagyság alapállapothoz viszonyított értéke (Trissl 1990; Gergely és mtsai. 1993). A relatív elektrogenicitások értékét a fotociklus első néhány köztes állapota esetén, a D85N, D212N, és D96N mutánsokon végzett kísérletek alapján határozták meg (Gergely és Váró 1992; Gergely és mtsai. 1993; Ganea és mtsai. 1995).

A jelen dolgozat tartalmazza a vad típusú BR fotociklusa köztes állapotai relatív elektrogenicitásának tanulmányozását pH 4,5 és pH 9 értékek között (**Ludmann és mtsai. 1998b**). Az elektrogenicitások pH függésének megrajzolásával következtetések vonhatók le a fotociklus folyamán történő belső töltésmozgásokról (**Ludmann és mtsai. 1998b**).

Megfigyelték, hogy a BR fotociklusa köztes állapotainak mindegyike fénnel újragerjeszthető (Litvin és Balashov 1977; Balashov és mtsai. 1995; Nagel

és mtsai. 1998). A K állapot vörös fénnel való megvilágításakor olyan elektromos jelet ad, melynek iránya ellentétes azzal a jellel, amit a vad típusú BR –ben sárga fénnel való gerjesztéskor észleltek (Ormos és mtsai. 1983; Trissl és mtsai. 1989; Groma és mtsai. 1995). Az M állapot kék fénnel való gerjesztés folytán a fehérje olyan fotocikluson megy keresztül, melynek több köztes állapota van (Litvin és Balashov 1977; Druckmann és mtsai. 1992; Nagel és mtsai. 1998), és elektromos jelet is ad (Ormos és mtsai. 1980; Dickopf és Heyn 1997). Az M köztes állapot ezen tulajdonságát olyan esetekben használják, amikor az M állapot koncentrációjának és lecsengésének mérése a cél, és nincs lehetőség abszorpció kinetikai mérések elvégzésére (Nagel és mtsai. 1998). Az N köztes állapot szintén fény-aktívnak bizonyult (Váró és Lanyi 1990).

A jelen dolgozatban a protonátlan Schiff bázist tartalmazó M állapot fotoreakciójának tanulmányozására is sor került optikai sokcsatornás analizátorral (OMA), abszorpció kinetikai és elektromos jel mérések segítségével, mind vad típusú, mind mutáns BR mintákon (**Ludmann és mtsai. 1999**).

1.4. Abszorpció kinetikai és elektromos jelekből kapott eredmények kombinálása: a BR energetikája

A BR energetikáját a csatolási princípiumok (Tanford 1983) alapján tárgyalták (Váró és Lanyi 1991b): a) a vezérlő reakció és a transzport összekötése két konformációs állapotot igényel; b) az összekötési reakcióban a szabadenergia az aktív helyről a fehérjére adódik át; c) a legtöbb átmenet esetében a szabadenergia változások zéróhoz közeli értékek kell legyenek; d) a transzport irreverzibilitását minimum egy, nagy szabadenergia veszteséggel járó lépés biztosítja. A bakteriorodopszin gerjesztett állapotában "birtokolt" szabadenergiája vezérli a kromofór és a fehérje összes termikus átalakulását és a protonátadás reakcióit (Birge és Cooper 1983; Ort és Parson 1979b). A K állapotban tárolt energia kalorimetriásan mért entalpiikus energiája 50 kJ/mol (Birge és mtsai. 1991).

A szekvenciális modell szerint (Váró és Lanyi 1991b) a BR fotociklusában két egyirányú átmenet van: az $M_1 \rightarrow M_2$ és az $O \rightarrow BR$. Ez is mutatja, hogy a K állapotban "birtokolt" szabadenergia diszkrét lépéseknél használódik el és nem disszipálódik folyamatosan az átmenetek során (Ludmann és mtsai. 1998a). A *Halobacterium salinarum* sejteken mért proton visszanyomás az M állapot felhalmozódását eredményezi (Dancsházy és mtsai. 1983; Groma és

mtsai. 1984), nem pedig az N vagy az O állapotokét, ami egyértelműen jelzi, hogy a proton transzportot az $M_1 \rightarrow M_2$ egyirányú reakció biztosítja. Ezt a megállapítást alátámasztja, hogy az N állapot kialakulásakor a proton transzportnak gyakorlatilag vége van (Otto és mtsai. 1989; Kouyama és Nasuda-Kouyama 1989; Váró és mtsai. 1990; Subramaniam és mtsai. 1991) és az is, hogy az $M_1 \rightarrow M_2$ átmenetben elveszített ΔG elégséges proton mozgató erőt hozhat létre.

A BR fotociklusában megfigyelhető mikroszkópikus sebességállandók hőmérsékletfüggésének megrajzolása az aktivációs entalpiák és entrópiák kiszámítását (van't Hoff aktivációs entalpiák és entrópiák), az átmenetek legtöbbje számára az entalpia- és entrópiánívók egymáshoz viszonyított helyzetének meghatározását is lehetővé tette (Váró és Lanyi 1991b). A $K \rightarrow L \rightarrow M_1$ és $M_2 \rightarrow N \rightarrow O$ reakciószegmensek termodinamikai paramétereinek kiszámítása már leírásra került pH 7 értéken, mind bíbormembránokon, mind bakteriorodopszin monomereken (Váró és Lanyi 1991b; Váró és Lanyi 1991). Az első szegmens reakciói izoenergikusan mennek végbe a ΔH , ΔS és ΔG lényeges változásai nélkül. A második szegmens reakciói szintén izoenergikusak, de figyelembe vették, hogy a protonleadás és protonfelvétel lépései között, az eredeti értékhez viszonyítva $\Delta H = -80$ kJ/mol entalpia veszteség lép fel (Ort és Parson 1979b; Garty és mtsai. 1982). Az entalpia diagram, az entalpia veszteséggel járó átmenetként az $M_1 \rightarrow M_2$ reakciót jelölte meg (Váró és Lanyi 1991b). Az $M_1 \rightarrow M_2$

átmenet után a maradék szabadenergia negatív entrópiaként jelent meg. Egy rendszer akkor képes negatív entrópiát létrehozni, ha nagyfokú belső szabadsággal rendelkezik. Ez kizárja a kromofór egyedüli részvételét és megköveteli, hogy a konfigurációs-konformációs változás, a fotociklus második felében, az M_2 állapot után jöjjön létre. Időfelbontásos Röntgen-diffrakciós mérések bebizonyították (Koch és mtsai. 1991), hogy konformációs változások valóban észlelhetők az $N \rightarrow BR$ átmenetben, ahol a legnagyobb entrópia változás bekövetkezik (Váró és Lanyi 1991b).

A fotociklus második felét a fehérje konformációs visszaalakulása vezérli. Az alább bemutatásra kerülő kísérletek már nemcsak széles hőmérséklet tartományon de széles pH tartományon is készültek, ami a fehérje energetikájának pontosabb megrajzolását és értelmezését, sőt néhol az átértelmezését eredményezte (Ludmann és mtsai. 1998a).

2. MINTÁK ÉS MÉRÉSI MÓDSZEREK

2.1. Mintakészítés, mérési körülmények

A vad típusú BR bíbormembránokat a *Halobacterium salinarum* S9 törzsből vonták ki az ismert módszer alapján (Oesterhelt és Stoeckenius 1974). A mérések elvégzésére a bíbormembránokat poliakrilamid gélbe ágyaztuk (Mowery és mtsai. 1979). A gélbeágyazott (Dér és mtsai. 1985) BR végső koncentrációja – 20-30 μM . A tridesztillált vízben jól kiáztatott gélek több órán át 50 - 100 mM NaCl –ban, 12,5-12,5 (esetenként 25-25) mM MES és TRIS pufferekkel a kívánt pH –ra beállított oldatban áztak. A só és pH gradiensek kiegyenlítésére a minták egész éjszakára a mérőoldatban maradtak. A mérőoldatban használt pufferek hőmérsékletfüggését két pH értéknél ellenőriztük: pH 5 és pH 8.5 értékeknél és az eltérés nem volt több ± 0.1 –nél. A mérések előtt a mintát fényadaptáltuk. A minta olyan mintatartóba került, amelyben a hőmérséklet 0 $^{\circ}\text{C}$ és 50 $^{\circ}\text{C}$ között beállítható, stabilizálható.

Az adatok gyűjtése egy számítógép vezérelt tranziens rekorder (Thurlby DSA 524) segítségével történt, több szakaszban, lineáris időskálán, 300 ns és 1 s között. Az adatokat utólag logaritmikus időskálára átalakítottuk egy, az intézetben kifejlesztett programmal. A logaritmikus időalapra való áttérés mellett a

jelek minőségének javulását is elértük. Az abszorpció kinetikai jelek mérése öt különböző hőmérséklet és tíz különböző pH értéken (5 °C és 30 °C, valamint pH 4,5 és pH 9 közötti tartományban) készült (Váró és Keszthelyi 1983). Az abszorpció kinetikai méréseket öt különböző hullámhosszon végeztük: 410 nm, 500 nm, 570 nm, 610 nm és 650 nm (Lanyi és Váró 1995). Az elektromos jel méréseket 20 °C hőmérsékleten végeztük pH 4,5-9 tartományban.

A D85N és D96N mutánsokat az L-33 törzsben expresszálták és J.K. Lanyi (Irvine, California, USA) laboratóriumából ajándékba kaptuk. A D85N mutánsban elektromos jeleket mértünk szobahőmérsékleten, gél mintán, 100 mM NaCl oldatban, amelyet 25-25 mM MES és Tris pufferekkel pH 9 értékre beállítottunk. Az optikai sokcsatornás analizátorral differencia spektrumokat mértünk a D96N mutánsból készült gél mintán a 350 nm és 750 nm közötti tartományban, háttérmegvilágítás mellett (HBO 200 típusú higanylámpa), szobahőmérsékleten, pH 8 értéken. A D96N mutánsból készült gél mintán abszorpció kinetikai és elektromos jeleket is mértünk pH 8 értéken, 6 különböző hőmérsékleten: 5, 10, 15, 20, 25 és 30 °C. A minta mérőoldata minden esetben 100 mM NaCl, 25-25 mM MES és Tris pufferekkel a kívánt pH értékre beállítva.

Az M állapot újragenerjesztéses módszerrel készült méréseit vad típusú bakteriorodopszinon végeztük. Az elektromos jeleket szobahőmérsékleten

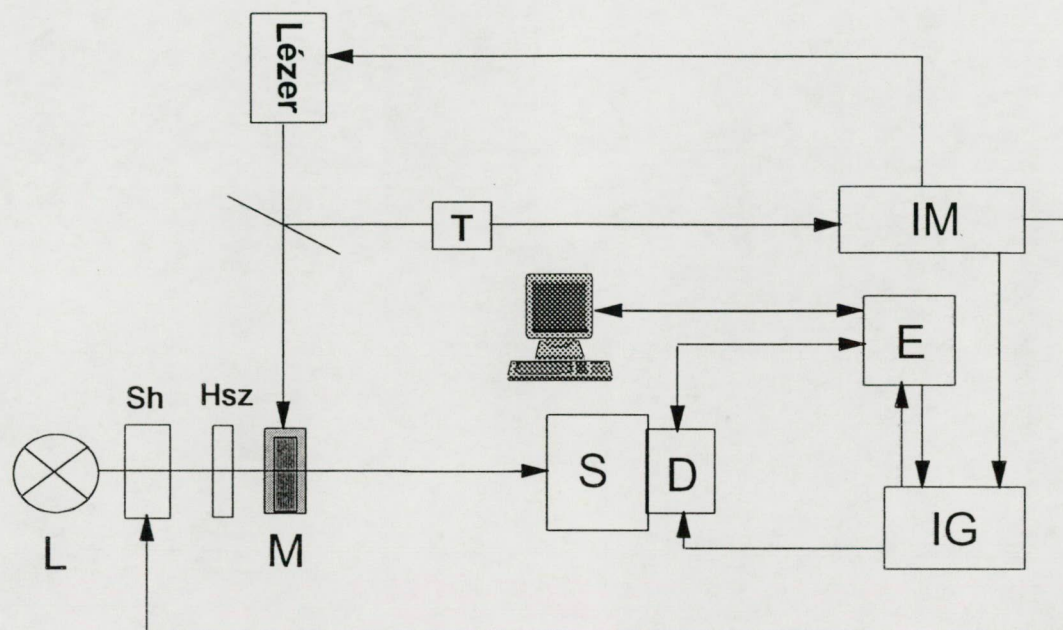
mértük 100 mM NaCl, 25-25 mM MES és Tris pufferekkel pH 9 értékre beállított mérőoldatban áztatott gél mintákon.

2.2. Optikai sokcsatornás analizátorral (OMA) mért jelek és azok kiértékelése

Az időfelbontásos spektroszkópiai méréseket a kapuzott optikai sokcsatornás analizátorral (OMA) végeztük (2.1. ábra) (Zimányi és mtsai. 1989; Zimányi és Lanyi 1993). A D96N mutáns fotociklusa folyamán, különböző időpillanatokban, differencia spektrumok mérésére nyílt alkalom. A gerjesztő fény egy excimer lézer pumpálta festék lézer volt, hullámhossza 420 nm, impulzushossza 8 ns, energiája 4 mJ. A mérőfény egy wolframszálas izzó volt.

A mérőfényt, a mintán való áthaladás után, a spektrográf (S) bemenő részére fókuszáltuk. A spektrumot a detektor (D) érzékeli, amelyben egy kapuzott gyors diódasor és egy nagyfeszültséggel vezérelt képerősítő foglal helyet. A nagyfeszültség időzítésével szabályozható, hogy a diódasor mikor és mennyi ideig érzékeli a ráeső fényt. A detektor az OMA ellenőrző rendszeréhez (E) van kötve, kapuzását az impulzus generátor (IG) végzi.

Az impulzus manipulátor (IM) által kibocsájtott jelek indítják el a lézert és az impulzus generátort, valamint szabályozzák a fényzárát (Sh).



2.1. ábra. Az optikai sokcsatornás analízátor (OMA) mérőberendezés vázlatos rajza. Lézer – excimer lézerekkel pumpált festék lézer, L – mérőfény (Wolfram izzó), Sh – fényzár, Hsz – hőszűrő, M – minta, S – spektrográf, D - detektor, T – optikai fényérzékelő, IM – impulzus manipulátor (nagyfeszültséggel vezérelt képerősítő), IG – impulzus generátor, E – ellenőrző rendszer.

A mérést indító jelet a detektor ellenőrző adja. A lézer gerjeszti a mintát és az optikai fényérzékelő (T) indítja az impulzus generátort. A generátor kiadja a megfelelő hosszúságú jelet a beállított időkésettetéssel és a detektor

érzékel a mintában okozott fényintenzitás változásokat. Az időfelbontás a fotodiódák fizikai paramétereitől és a nagyfeszültséget kapcsoló elektronikától függ.

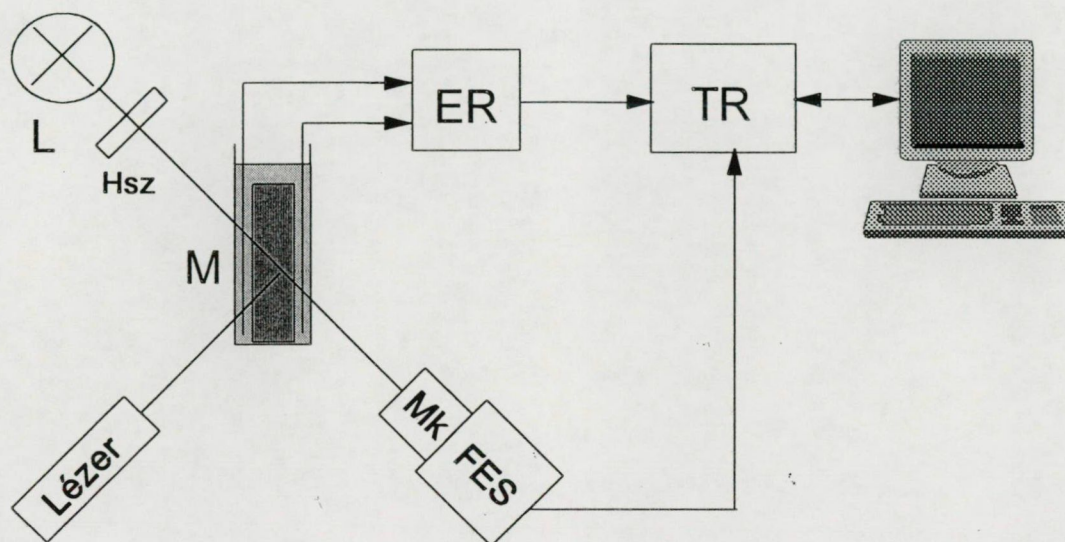
Az adatok gyűjtése a gerjesztést követően 0,2 μs ; 0,4 μs ; 0,6 μs ; 1 μs ; 2,5 μs és 6 μs késleltetéssel történt. A jelek 100 ismétlés átlagai, így nagymértékben javult a jel-zaj viszony. A spektrumok komponens spektrumokra bontását az SVD (sajátértékekre való bontás) módszerrel, az SPSEV program segítségével végeztük (Cao és mtsai. 1993; Bagyinka és mtsai. 1993). Ugyancsak az SPSEV program adott lehetőséget a zajszűrésre és az abszorpció kinetikai jelek globális illesztésére.

Az OMA-val mért komplex spektrumok jól meghatározott amplitúdókkal rendelkező komponens spektrumokra bonthatók, melyekből elhagyhatók azok, amelyeknek nincs struktúrájuk.

2.3. Abszorpció kinetikai jelek mérése és kiértékelése

A gél mintát küvettába helyeztük és egy excimer lézer pumpálta festéklézerrel gerjesztettük (Rodamin 6G, etanolban): hullámhossza 590 nm, impulzushossza 5 ns, energiája 10 mJ. A lézer körülbelül 15% BR -t gerjesztett ki a

mintából. A gerjesztés irányára merőlegesen helyeztük el a mérőfény szerepét betöltő wolfram szál izzót. A lézer által a mintában okozott abszorpcióváltozás a



6. ábra. Az abszorpció kinetikai és elektromos jelek együttes mérésére használt berendezés vázlatos rajza: Lézer – excimer lézer pumpálta festék lézer, L – mérőfény, Hsz – hőszűrő, Mk – optikai szűrő, FES – fotoelektronsokszorozó, ER – erősítő, TR – tranziens rekorder.

mérőfény fényintenzitásának változását okozza. A jel a monokromátoron és fotoelektronsokszorozón keresztül a tranziens rekorderbe jut és számítógép rögzíti (lásd a 2.2. ábrát).

A mérés házilag készített számítógépes programmal vezérelt. Az adatok összegyűjtésekor az egyes lézerimpulzusok intenzitását is mértük, a jeleket egy lézerintenzitásra normáltuk így a lézerintenzitás $\pm 15\%$ -os ingadozását kiküszöböltük.

A háttér-megvilágítással készült mérések esetében egy higanylámpát (HBO 200) használtunk, ami elé egy hőszűrő és egy alul vágó üveg (500 nm) került. Így a lámpa 57 W/cm^2 megvilágítást adott az 500-800 nm hullámhossz tartományban.

Az M állapot kigerjesztésére, háttérfény mellett egy excimer lézer gerjesztette festék lézert használtunk: hullámhossza 420 nm, impulzushossza 10 ns, energiája 4 mJ. A kettős gerjesztéses kísérleteinkhez az excimer lézer gerjesztette festék lézert használtuk: hullámhossza 590 nm, és egy nitrogén lézer pumpálta festék lézert: hullámhossza 420 nm, impulzushossza 8 ns, energiája 0.5 mJ. A két lézer közötti késleltetést házi készítésű időzítővel hoztuk létre, melynek legkisebb késleltetése $1\mu\text{s}$.

A különböző hullámhosszaknál mért abszorpció változások a látszólagos sebesség állandókat tartalmazzák. Első lépésben a spektrális változások a köztes állapotok időfüggő koncentráció változásai alakítottuk az alábbi összefüggés alapján:

$$\Delta A_{\lambda}(t) = \sum_i \Delta \varepsilon_{\lambda i} \cdot C_i(t) \quad (2.1.)$$

Ahol $\Delta A_{\lambda}(t)$ -az egyes hullámhosszaknál mért abszorpció változásokból felépített oszlop mátrix, az $\varepsilon_{\lambda i}$ -az extinkciós együtthatók mátrixa (Gergely és mtsai. 1997), a $C_i(t)$ -pedig a fotociklus köztes állapotainak koncentrációiból felállított oszlop mátrix. A fotociklus köztes állapotai időfüggő koncentráció változásaira modellt illesztettünk egy, a Biofizikai Intézetben Groma Géza által megírt, RATE nevű programmal (Gergely és mtsai. 1993; Váró és mtsai. 1995). Az illesztés eredményeképpen megkaptuk a fotociklus köztes állapotai közötti átmenetekhez tartozó mikroszkópikus időállandókat. A termodinamikai paraméterek kiszámítása az alábbi egyenletek segítségével történt:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^*}{R \cdot T} + \frac{\Delta S^*}{R} + \ln \frac{k_B \cdot T}{h} \quad (2.2.)$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \cdot \Delta S^* \quad (2.3.)$$

ahol k a sebességállandó, k_B - a Boltzmann állandó, h - a Planck állandó, T - az abszolút hőmérséklet, R - az egyetemes gázállandó, ΔH , ΔS és ΔG az egyes

átmenetekhez tartozó entalpia, entrópia és szabadenergia változást jelenti, ΔH^* , ΔS^* és ΔG^* pedig az aktivációs entalpia, entrópia és szabadenergia értékek.

2.4. Elektromos jelek mérése és kiértékelése

Az abszorpció kinetikai jelek mérésére használt berendezés (2.2. ábra) alkalmas az elektromos jelek mérésére is, ha a kuvettába helyezett orientált, gél minta mellé elektródapárt helyeztünk. Lézergerjesztés folytán a mintában a töltésmozgások által keltett áramjel egy erősítőn keresztül a tranziens rekorderbe kerül és számítógép rögzíti. Az elektromos jeleket több időalapon mért jel "összevarrásából" kaptuk meg és logaritmikus időskálára alakítottuk át. Az elektromos jeleket az abszorpció kinetikai jelekből kiszámolt, a köztes állapotokhoz tartozó, koncentrációk felhasználásával illesztettük. A mért áramjel integrálja arányos a membránon generált feszültséggel, amit az alábbi összefüggés ad meg:

$$U(t) = A \cdot \sum_i C_i(t) \cdot E_i \quad (2.4.)$$

ahol $U(t)$ - a feszültség, A - a mérési feltételeket magába foglaló állandó, E_i - az elektrogenicitás és $C_i(t)$ - az i -edik köztes állapot koncentrációja. Az elektromos jel

első, gyors komponense a kezdeti töltésszétválasztásnak, a retinál izomerizációjának felel meg.

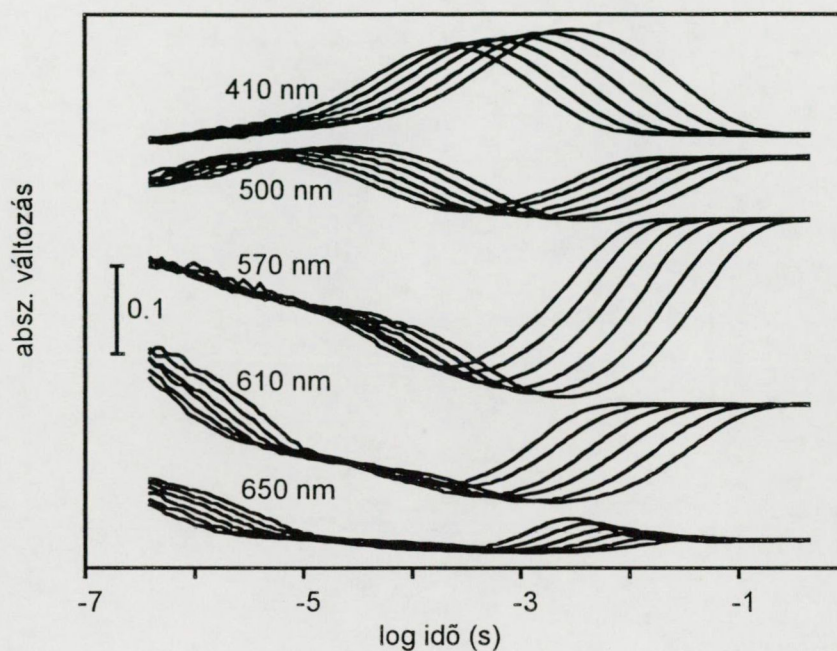
A töltésmozgások leírására az elektrogenitási együtthatókat (röviden: elektrogenitást) használtuk. A köztes állapot elektrogenitását eredetileg úgy definiálták (Gergely és mtsai. 1993), mint az alapállapothoz viszonyított dipólusmomentum változást. Az elektromos jelek csak a membrán síkjára merőleges dipólusmomentum változásokból születnek. Az elektrogenitás jelét pozitívnak tekintettük, ha a dipólusmomentumban bekövetkező változás ekvivalens egy pozitív töltésnek, a membránban, a proton transzport irányába történő eltolásával. Megegyezés szerint az első jel relatív elektrogenitása -1 , az időben következő jeleket pedig hozzá normaljuk. Mutánsok esetében is az első jel relatív elektrogenitása -1 , azt a hipotézist tartva szem előtt, hogy a mutáció a retinál közvetlen környezetét nem változtatja meg.

Az elektromos jelek illesztése a MATLAB program segítségével készült. A relatív elektrogenitások kiszámításakor, a nagy hibák elkerülése végett a számításokat, a feszültség jel két lépésben történő illesztésével végeztük. Ábrázolva a relatív elektrogenitások pH függését lehetőség nyílik a protonleadás és protonfelvétel körülményeinek, a fehérjén belüli töltésmozgásoknak, valamint az egyes köztes állapotok megjelenésének és eltűnésének feltérképezésére alacsony és magas pH értékeknél.

3. EREDMÉNYEK

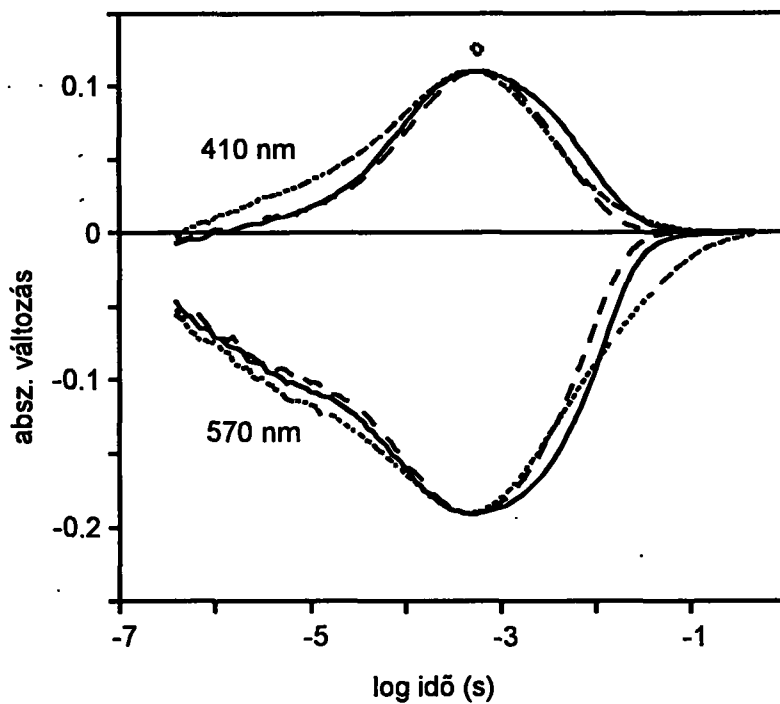
3.1. Abszorpció kinetikai mérések:

A 3.1. ábrán a fotociklus köztes állapotaira jellemző öt különböző hullámhosszon mért abszorpció kinetikai jelek láthatók, pH 7 értéken és hat különböző hőmérsékleten. A hőmérséklet 25 °C-al való növelésével a jelek felfutása egy nagyságrenddel gyorsabb. Ez lehetőséget adott a termodinamikai paraméterek kiszámítására, az Eyring ábrázolás elkészítésére (Váró és Lanyi 1991a). A kinetika hőmérséklet függése sokkal hangsúlyosabb mint a pH függése, ahogyan a 410 nm és 570 nm hullámhosszakon, pH 5, pH 7 és pH 9 értéken mért jelekből látszik, amelyeket külön-külön, saját extrémumaikra normáltuk (3.2. ábra). A pH értéknek két egységgel való növelése megfelel a hőmérsékletnek kevesebb mint 5 °C fokkal való növelésével elérhető változással. Ezért a mérő oldat pH értékének ± 0.1 pH egységgel való változását a hőmérséklettel elhanyagolhatónak tekintettük. A K állapot felfutási sebessége 20 °C hőmérsékleten szinte teljesen pH független (570 nm hullámhosszon mért jelek, 3.2. ábra). Alacsony pH értékeknél a fotociklus 410 nm hullámhosszon (vagyis az M állapotot mutató) mért jeleinek felfutása nem változott, de gyorsabbá vált ha a pH értékét 7 -ről 9 -re változtattuk.



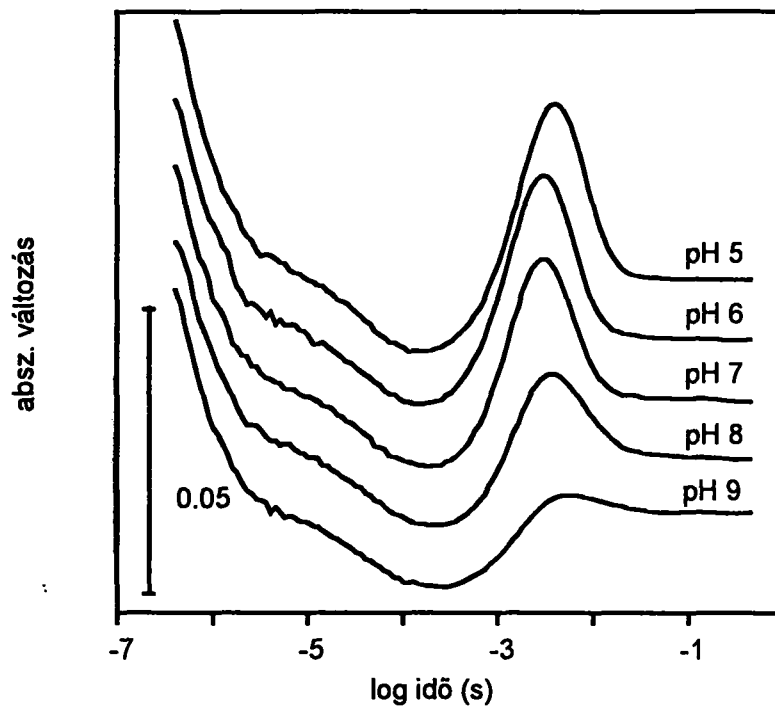
3.1. ábra. Akrilamid gélbe ágyazott bíbormembránokon mért abszorpció kinetikai jelek pH 7 értéken, öt különböző hullámhosszon és hat különböző hőmérsékleten, jobbról balra: 5, 10, 15, 20, 25, 30 °C.

Ezt a gyorsulást a Glu 204 titrálásának tulajdonítják (Brown és mtsai 1995; Richter és mtsai. 1996; Balashov és mtsai. 1996). A pH 4.5-ről pH 7-re való átmenetnél a jelek lecsengése gyorsul; később viszont, pH 7-ről pH 9-re való ugrásnál lassul. A 3.1. ábrán a jelek amplitúdójából látható, hogy azok csak gyengén hőmérsékletfüggőek, kivéve az O köztes állapotra jellemző 650 nm hullámhosszon mért jelet, amely erős hőmérsékletfüggést mutat.



3.2. ábra. Abszorpció kinetikai jelek 410 nm és 570 nm hullámhosszakon, 20 °C fokon és három különböző pH értéken: pH 5 (folytonos vonal), pH 7 (szaggatott vonal) és pH 9 (pontozott vonal). A mérési körülmények mint az 3.1. ábrán. A jeleket az extrémumaikra normalizáltam.

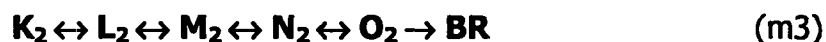
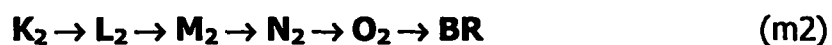
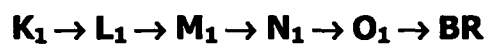
A 650 nm hullámhosszon mért jelekben még pH 9 –en is megfigyelhettük az O köztes állapotot ha a hőmérsékletet 30 °C fokra emeltük (3.3. ábra). Ez arra utal, hogy az O állapotnak az eltűnése alacsony hőmérsékleten energetikai okok miatt következik be.



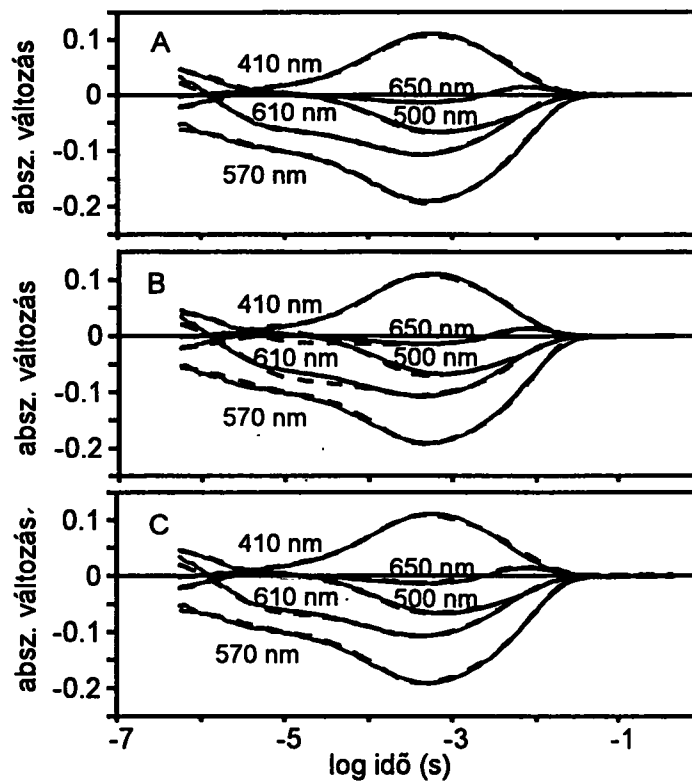
3.3. ábra. Abszorpció változás 650 nm hullámhosszon és 30 °C fokon, öt különböző pH értéken.

Az abszorpció változások nagyon összetettek, és nem írhatók le egyszerű kinetikai modellel. Az alábbiakban felvázolom azokat a modelleket, amelyeket a modellillesztéseink során figyelembe vettünk: reverzibilis reakciókat tartalmazó szekvenciális modell (m1) (Ames és Mathies 1990; Váró és mtsai. 1990; Váró és Lanyi 1990; Váró és Lanyi 1990); két párhuzamos fotociklus modell, egyirányú reakciókat feltételezve a köztes állapotok között mindkét ágban (m2) (Dancsházy és mtsai. 1988; Tokaji és Dancsházy 1992; Drachev és mtsai. 1993;

Eisfeld és mtsai. 1993; Song és mtsai. 1994); két párhuzamos fotociklusból álló modell, reverzibilis reakciókat feltételezve a köztes állapotok között mindkét ágba (m3) (Eisfeld és mtsai. 1993; Hendlér és mtsai. 1994; Luchian és mtsai. 1996):

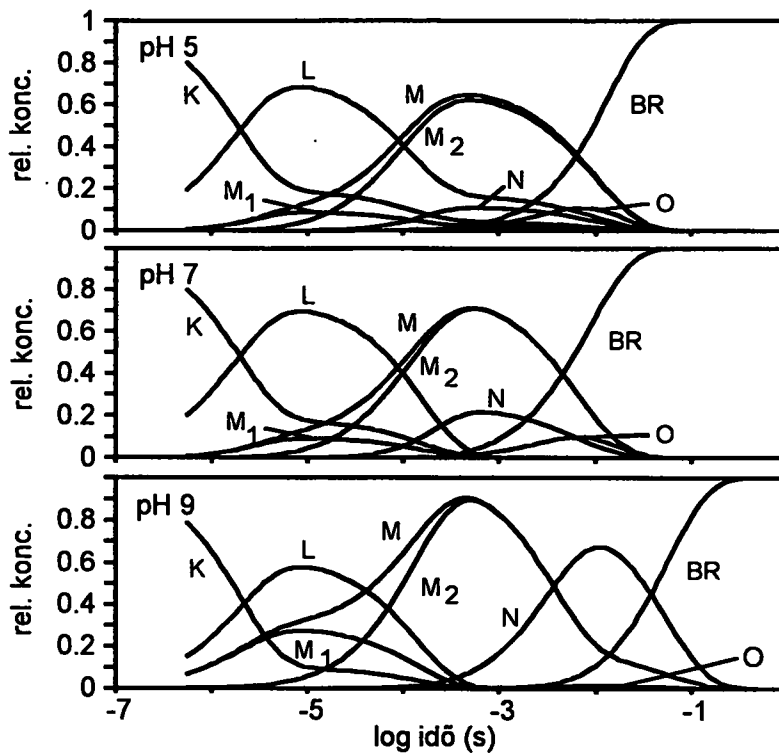


Az m1-es modell esetén az illesztés jóságát mutatja a $\chi^2 = 2.4 \times 10^{-3}$; és hibán belül jó illeszkedést adott az összes tanulmányozott pH és hőmérsékleti értékre (3.4. A. ábra). pH 8.5 és pH 9.0 értékek esetében a χ^2 enyhe emelkedése volt jellemző, ami a modell alkalmazásának határait mutatja. Az m1 modellben látható elágazást már előzőleg bevezették (Váró és Lanyi 1990; Váró és mtsai. 1990).



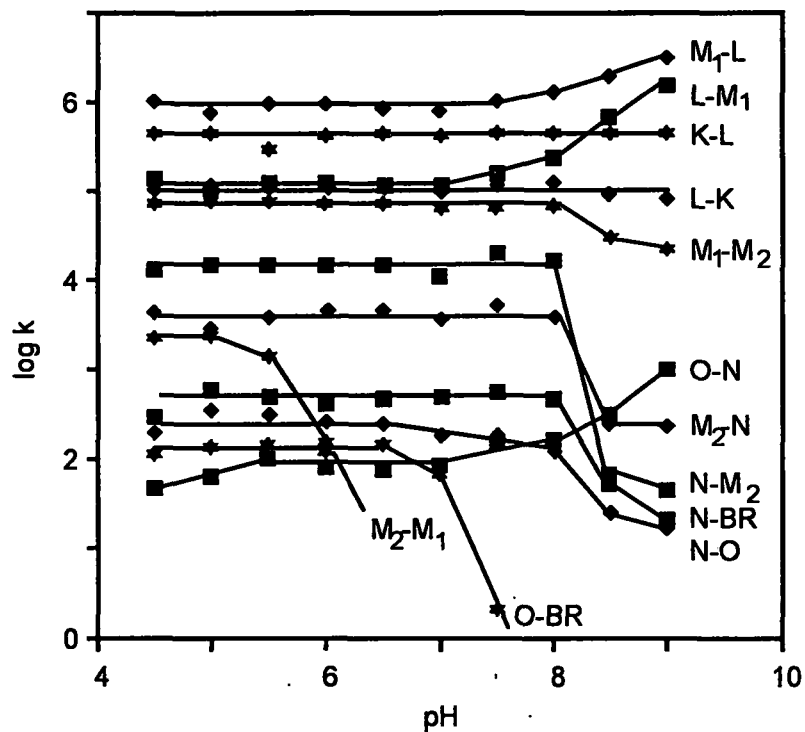
3.4. ábra. pH 7-en, 20 °C-on mért abszorpció kinetikai jeleknek (folytonos vonalak) a három bemutatott modellel való illesztése (szaggatott vonalak).

pH 4.5 és pH 7 között az N lecsengésének egyidejűleg két útja lehetséges: $N \rightarrow BR$ és $N \rightarrow O \rightarrow BR$. pH 7 érték fölött a lecsengés az $N \rightarrow BR$ átmeneten keresztül valósul meg.



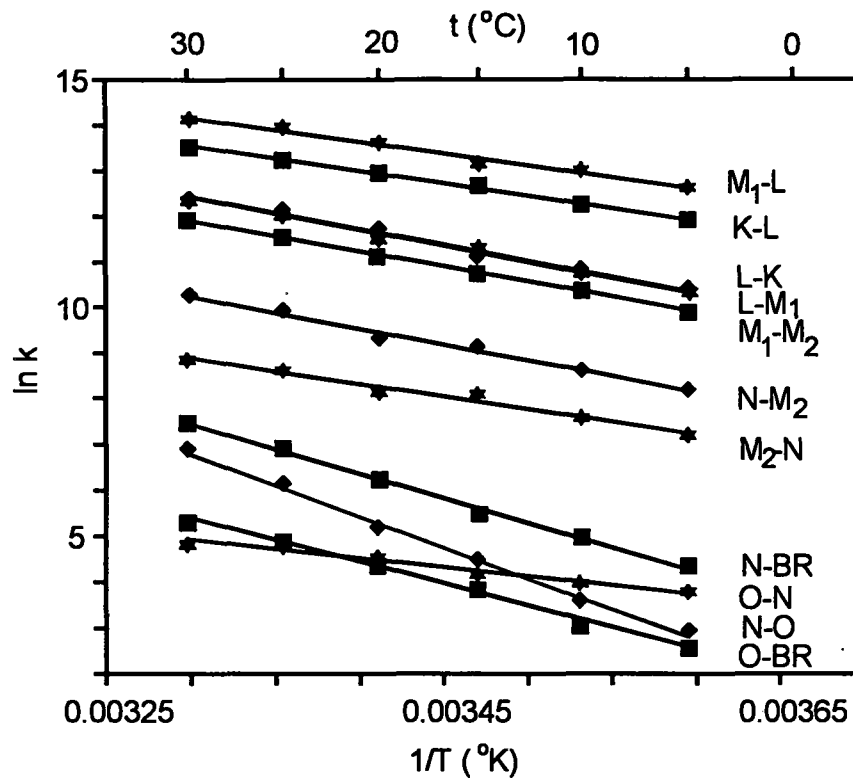
3.5. ábra. A szekvenciális modellel való illesztésből számított koncentrációváltozások időfüggése három különböző pH érték esetén.

Az m2-es modell kevésbé jó illeszkedést mutatott, $\chi^2 \approx 8.9 \times 10^{-3}$, és az m3-as modell egyetlen változata sem ad jobb illeszkedést az m1-es modellnél, $\chi^2 \approx 2.2 \times 10^{-3}$, ugyanakkor sokkal több paramétert tartalmaz. A köztes állapotok koncentráció változásának pH-függése (3.5. ábra) azt mutatja, hogy az M_1 és M_2 köztes állapotok közötti átmenet alacsony pH-n egyensúlyban van, de pH 6 fölött egyirányúvá válik.



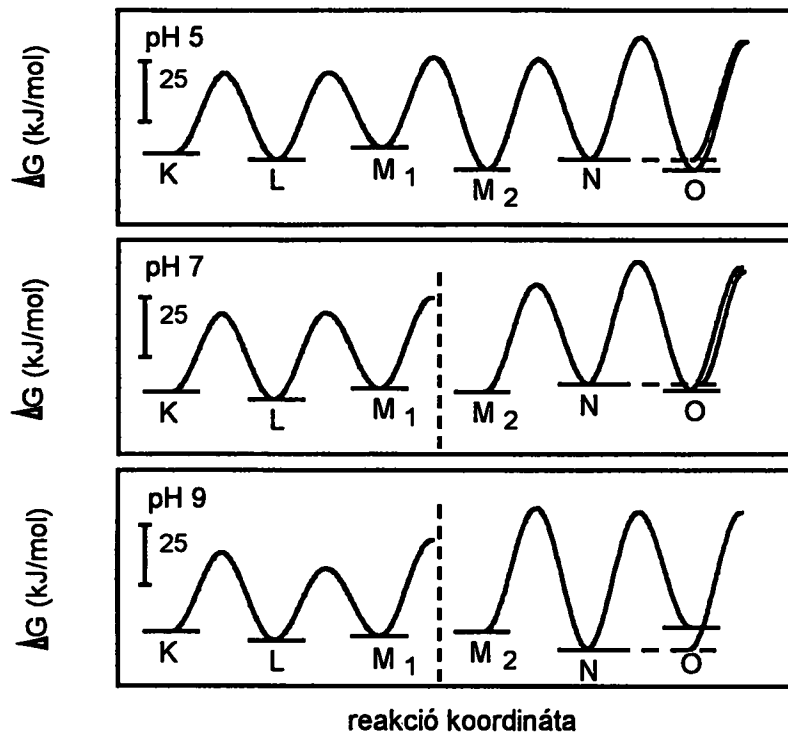
3.6. ábra. A sebességállandók tízes alapú logaritmusának pH függése.

A pH növekedésével az L és O köztes állapotok koncentrációja csökken, az M₁ és N köztes állapotok koncentrációja pedig növekszik. Az O és BR állapotok közötti átmenet pH 7 és pH 8 értékek között egyirányúvá válik (3.6. ábra). A K és L köztes állapotok közötti átmeneten kívül az összes többi átmenet sebessége változik pH 7 érték fölött.



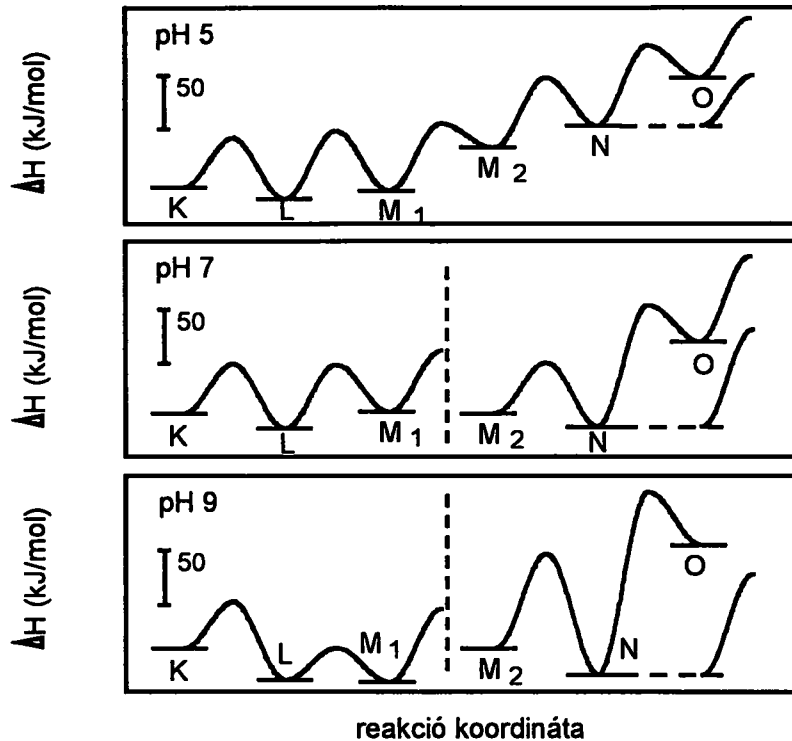
3.7. ábra. A sebességkonstansok Eyring ábrázolása a pH 7-en mért jelek alapján, a reverzibilis reakciókat tartalmazó szekvenciális modell figyelembevételével.

Az m1-es modell alapján elkészített Eyring ábrázolás minden pH értékre lineáris függést mutat (pH 7.0, 3.7. ábra). Nemlineáris Eyring ábrázolást mutatnak a párhuzamos modellekből kiszámított sebességállandók (nem készült ábra), ami megkérdőjelezi a párhuzamos modellek fizikai értelmezhetőségét. Ezért csak az m1-es modellt tárgyaljuk. A 3.7. ábrán látható, hogy a



3.8. ábra. A három pH értékre számított szabadenergia diagram.

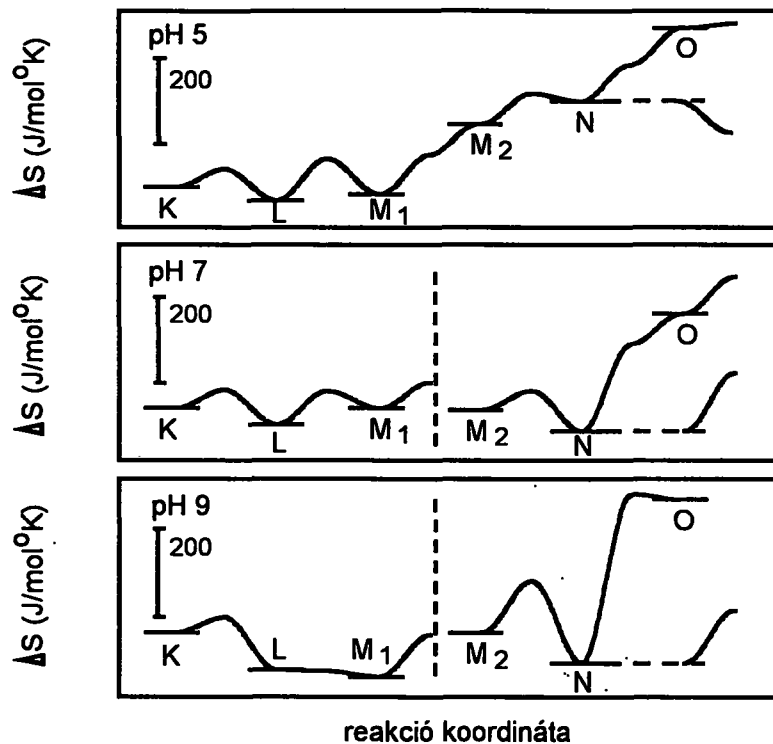
fotociklus második felében három, erősebben hőmérsékletfüggő átmenet létezik: az $N \rightarrow O$, az $N \rightarrow BR$ és az $O \rightarrow BR$ átmenet, ami pH 7 értéken létező magasabb aktivációs barriert jelent (ezekre az átmenetekre). A pH növekedésével a köztes állapotok energia nívoiban több jellegzetes változás észlelhető (3.8. – 3.10. ábrák): az N állapot energianívója eltolódik, és hasonlóképpen kisebb eltolódás az M₁ energianívójában is megfigyelhető. A K köztes állapot energianívója ebben a munkában nem került meghatározásra, de referenciaként szolgált, mivel a fehérje



3.9. ábra. Az entalpia diagram pH 5, pH 7 és pH 9 értékeken.

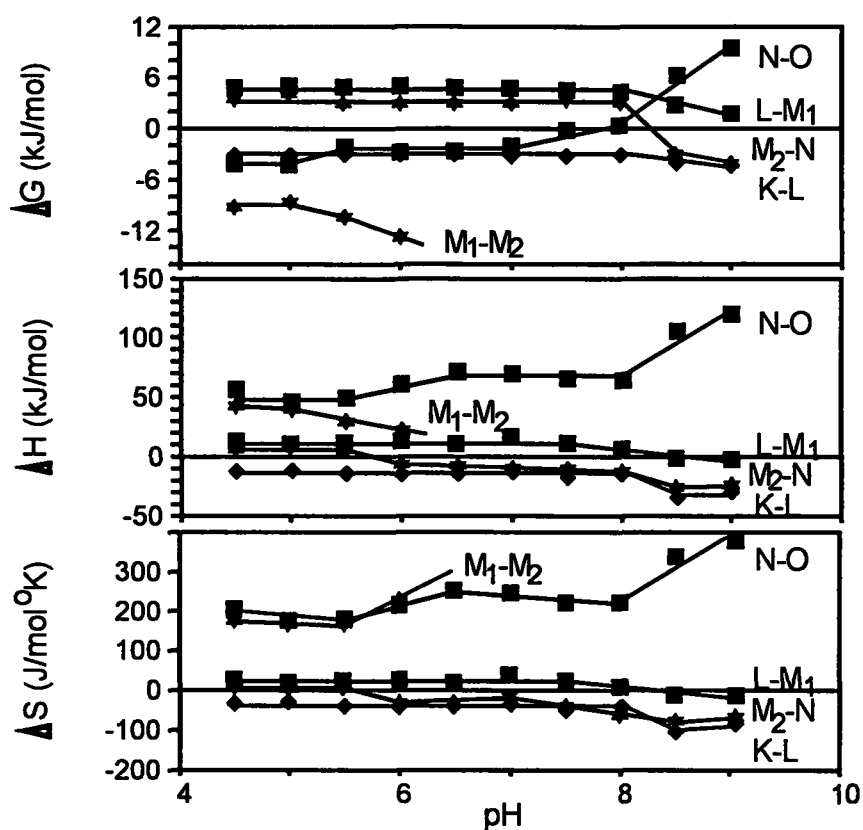
által elnyelt, és ebben az állapotban tárolt energia egy része a protonnak a membránon keresztüli szállítására szolgál.

Amikor az M₁ és M₂ köztes állapot közötti átmenet egyirányúvá válik, a két energianívó közötti különbség nem határozható meg. Ezért magasabb pH értéken az M₂ energia szintjét tetszőlegesen rajzoltuk. A M₂ energianívója



3.10. ábra. Entrópia diagram pH 5, pH 7 és pH 9 értéken.

számításaink szerint jóval alacsonyabb. Az utolsó, BR-be történő, átmenet egyirányúságára onnan következtettünk, hogy gerjesztés nélkül a mintában a BR állapoton kívül más köztes állapot (N és O) nincs jelen, a BR alapállapot spektruma a tanulmányozott pH tartományban nem változott. Ezeknek az átmeneteknek az energianívói nincsenek pontosan meghatározva. Az egyirányúság elvét követve belátható, hogy magas pH értéken az M₁ és M₂ illetve az N, O és a BR köztes



3.11. ábra. A köztes állapotok szabadenergiában, entalpiában és entrópiában fellépő változásai az őket megelőző köztes állapotokra vonatkozó értékekhez viszonyítva.

állapotok közötti szabadenergia nivóinak különbsége nagyobb kell legyen mint 11 kJ/mol. Az entalpia (3.9. ábra) és az entrópia (3.10. ábra) diagramokból az energia lokalizálásáról és a fehérjén belüli konformáció változásokról szerezhetünk információt. Két olyan átmenet van az entrópia diagramján (3.10. ábra), ahol

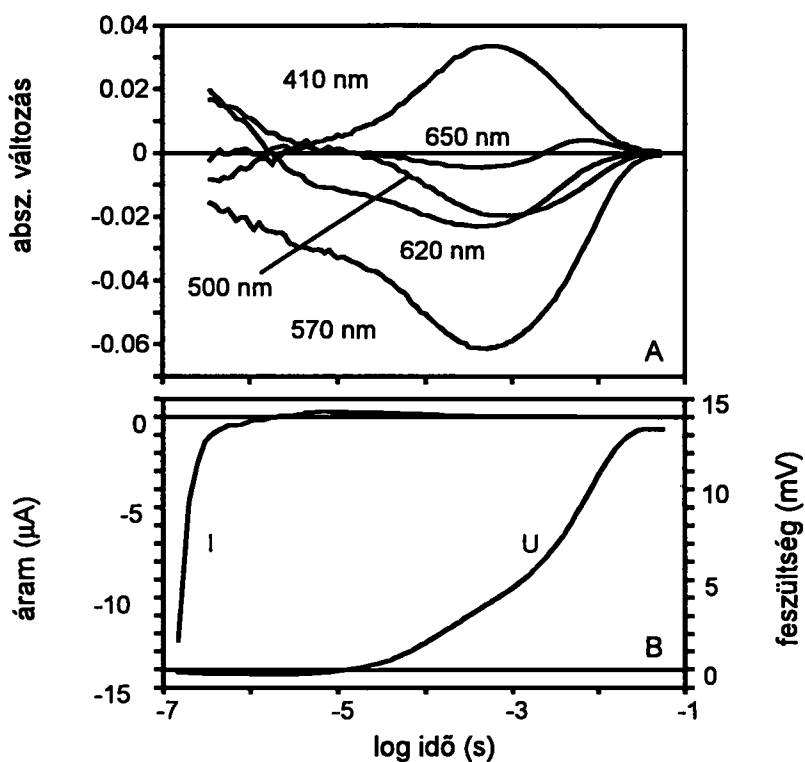
entrópia növekedés észlelhető: az egyik az M1 és M2 állapotok, a másik pedig az N és O állapotok közötti.

Ezek a különbségek még inkább észlelhetők, ha az egymás utáni energianívók közötti különbséget a pH függvényében ábrázoljuk (3.11. ábra). Az első esetben az entrópia növekedést entalpia csökkenés kíséri és ez szabadenergia csökkenést eredményez. Ez okozza az átmenetnek az M₂ köztes állapot felé történő egyirányúságát, és pH 6 felett ez rejti el a visszareakciót. A pH növekedésével az N és O közötti átmenet mind entrópia mind pedig entalpia növekedéssel jár, ami a szabadenergia növekedését vonja maga után és ez magas pH értékek esetén magát az átmenet előrehaladását nehezíti.

A szabadenergia diagramja (3.8. ábra), a fehérje teljes energiáját mutatja és azt, hogy az M₂ és az O köztes állapotok nívója nem változik, csak az N köztes állapot energia nívója tolódik el, ami végső soron az M₂ és az N közötti energia barrier növekedését vonja maga után.

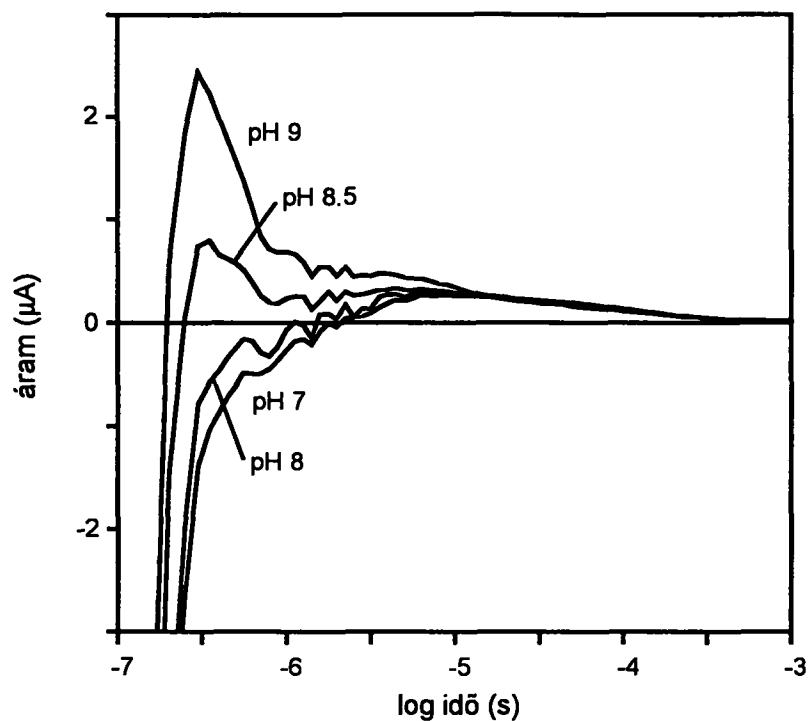
3.2. Elektromos jel mérések:

Az orientált gél minták alkalmasak az abszorpció kinetikai és elektromos jelek együttes mérésére (a berendezést lásd a 2.2. ábrán).



3.12. ábra. A. Abszorpció kinetikai jelek (410 nm, 500 nm, 570 nm, 620 nm, 650 nm hullámhosszakon). B. elektromos áramjel (I), valamint a kiszámított feszültség jel (U), pH 7 értéken és 20 °C fokon.

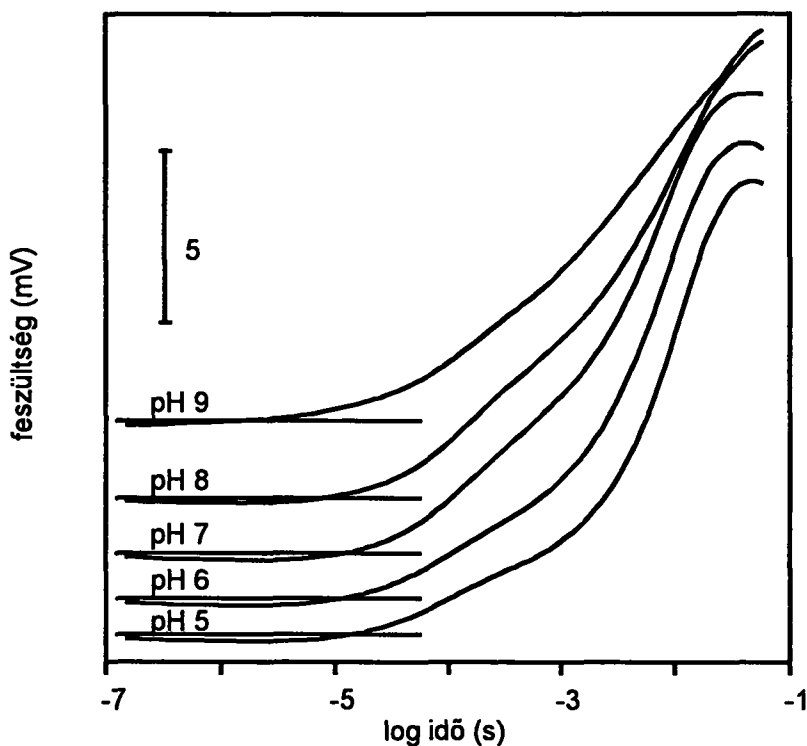
A 3.12.(A) ábrán öt különböző hullámhosszon mért abszorpció kinetikai jelet, a 3.12.(B) ábrán áramjelet és a kiszámított feszültség jelet tüntettük fel.



3.13. ábra. Az áramjelek gyors komponensének pH-függése. A kísérleti körülmények azonosak a 3.12. ábrán leírtakkal.

A mérések pH 7 értéken, szobahőmérsékleten készültek. Az irodalomból már ismert, hogy az abszorpció kinetikai és elektromos jelek a fotociklussal korrelálnak. Az elektromos jel analíziséhez szükség van az időállandókra és a köztes állapotok időfüggő koncentráció változásaira (3.12.(A) ábra). A pH 7 értéken készült

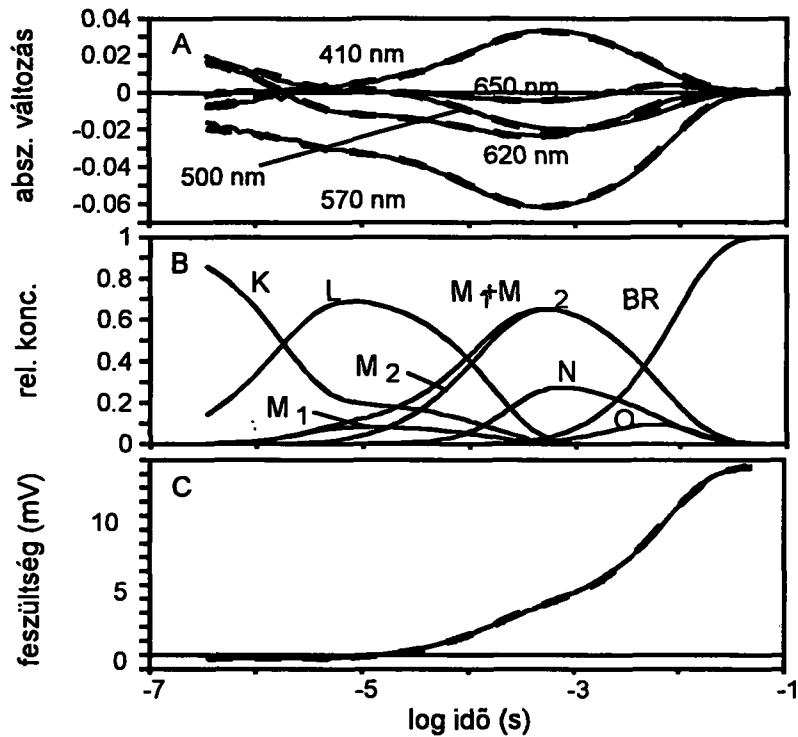
abszorpció kinetikai jeleken feltüntetett hullámhosszak a BR fotociklusa köztes állapotaira jellemzők.



3.14. ábra. A feszültség jelek pH függése. A kísérleti körülmények azonosak a 3.12. ábrán leírtakkal. A vékony vonalak a zero feszültségértéket jelzik.

A 3.12. B. ábrán bemutatott áramjel és feszültség jel a fotociklus folyamán a fehérjén belül létrehozott töltésmozgásokról ad számot. A gyors töltésmozgásokat inkább az áramjel mutatja, míg a lassú töltésmozgások leírására a feszültség jel alkalmasabb. A feszültség jelen végeztünk modellillesztést. Az áramjelek (3.13.

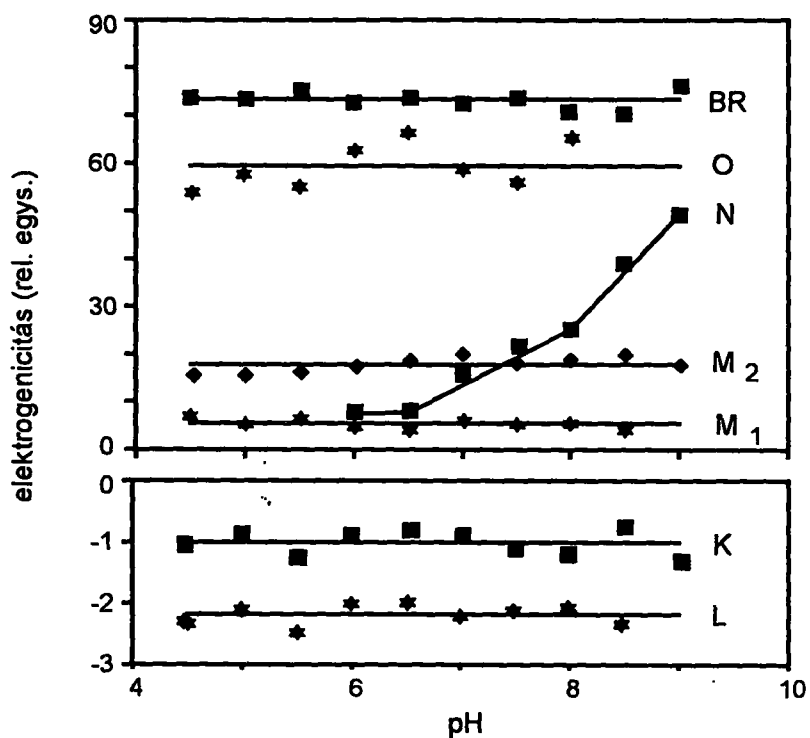
ábra) pH 7 érték felett, a száz nanoszekundumos időtartományban, egy jellegzetes csúcsot mutatnak.



3.15. ábra. Az abszorpció kinetikai jelek illesztése (A), a köztes állapotok koncentrációinak időfüggése (B), és a feszültség jel illesztése (C). A kísérleti körülmények azonosak a 3.12. ábrán leírtakkal, pH 7 értéken.

Ebben az időtartományban nincs nagy különbség az abszorpció kinetikai jelek között, egyedül az M köztes állapot megjelenésének gyorsulása észlelhető. A feszültség jelben a negatív fázis hamarabb eltűnik a pH növekedésével (3.14.

ábra), a pozitív rész lassabban fut fel, amint maga a fotociklus is jóval lassabb. Az adatok feldolgozásánál az abszorpció kinetikai jelek az elsőrendű reverzibilis

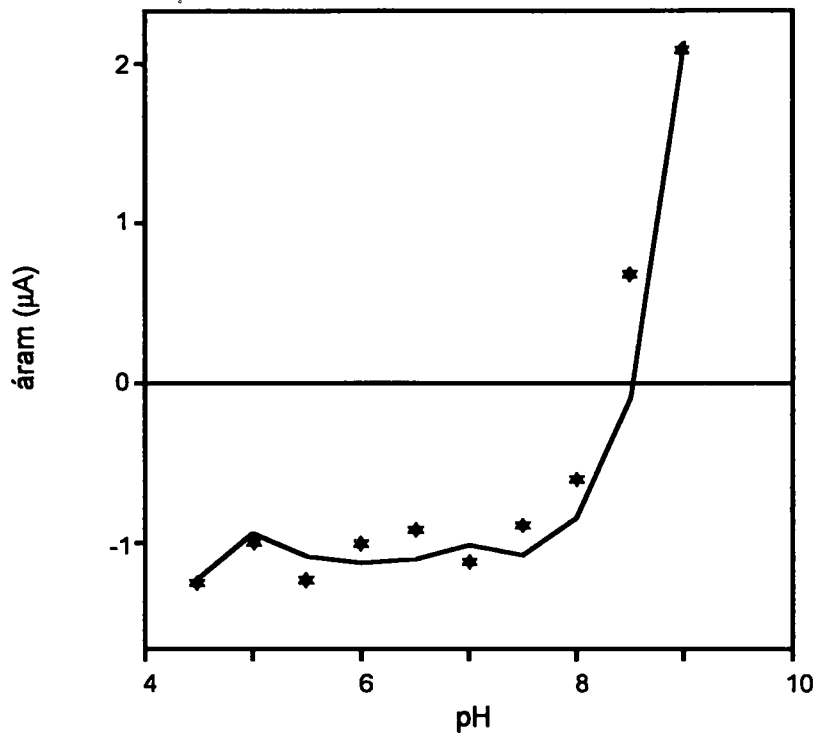


3.16. ábra. A köztes állapotok elektrogenitásainak pH-függése. A vízszintes vonalak a megfelelő elektrogenitások átlagértékét jelzik. A hiba kisebb $\pm 15\%$ -nál.

reakciókat tartalmazó szekvenciális modellel illesztettük, egyirányú átmenetet ez a modell csak az utolsó lépésben tartalmaz.

Az illesztést ugyanúgy végeztük, mint az előbb leírtaknál. Az illesztés az egész pH tartományban egyformán jó volt. A pH 7 értékre készült

illesztést a 3.15. A. ábra mutatja. A köztes állapotok időfüggő koncentrációit (3.15.(B) ábra) a köztes állapotok elektrogenicitásainak kiszámítására,

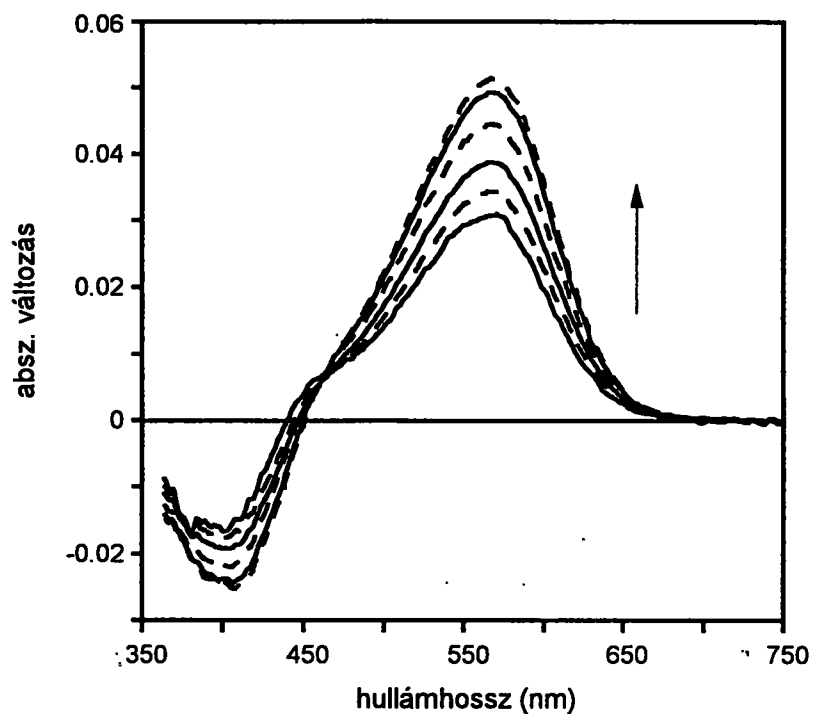


3.17. ábra. Magas pH értéken megjelenő pozitív áramjel mért és számított értékeinek összehasonlítása. 250 ns-mal a gerjesztés után, az áramjel mért érték (csillag) és az ugyanarra a pontra számolt érték (vonal), a két extrém pH értékre normalizálva.

a 2.4. egyenlet segítségével, használtuk fel. Mivel az időpontok száma jóval nagyobb, mint az ismeretlen elektrogenicitások száma, az egyenletrendszer túldeterminált. A megoldás a legkisebb négyzetek módszerével, a MATLAB programban készült. A fotociklus gyors részében az elektrogenicitások értéke egy

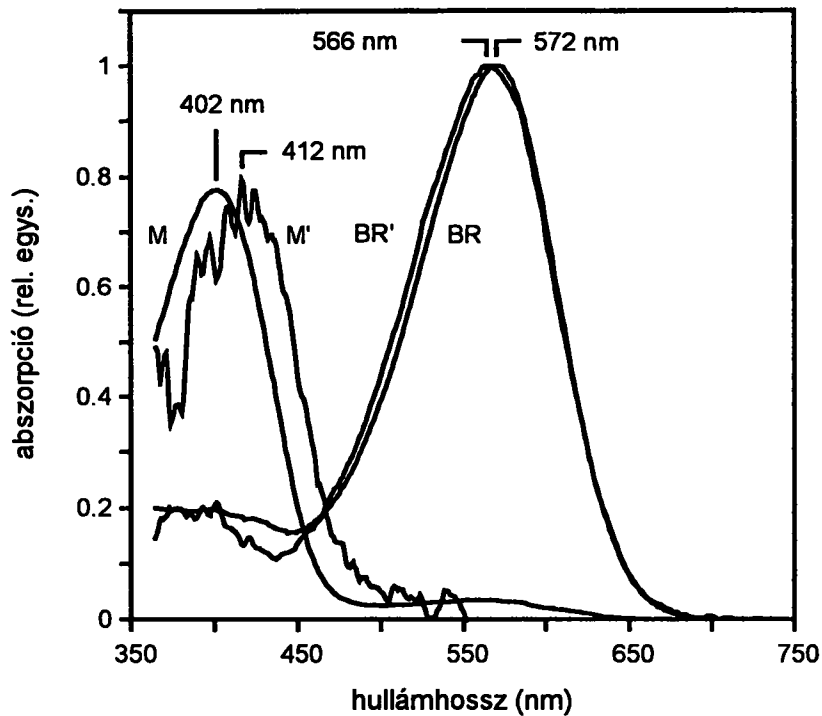
nagyságrenddel kisebb, mint a lassú részben. Hogy a hibákat elkerüljük a számításokat két lépésben végeztük: előbb a feszültség jel első részét illesztettük, amikor csak a K, L és M_1 köztes állapot van jelen. Azután ezeket az értékeket rögzítve a későbbi köztes állapotok elektrogenicitásának kiszámítása következett, a teljes feszültség jel figyelembe vételével. Az eredmény a 3.15.(C) ábrán látható. Az elektrogenicitások pH-függésénél jól látszik, hogy a fotociklus összes köztes állapotaira kiszámított értékek (kivéve az N állapotra számított elektrogenicitást) pH-függetlenek (3.16. ábra). Ez látszólagos ellentmondásban áll a 3.13. ábra adataival. Hogy ezt tisztázzuk, a fotociklus első néhány köztes állapota elektrogenicitásának ellenőrzésére elméleti számításokat végeztünk az áramjel első 5 megmért pontjában. A koncentrációk deriváltját a köztes állapot elektrogenicitásának értékével szoroztuk. A lézergenerálás után 250 ns-nál mért áramjelet és az elméletileg számolt jelet a két szélső pH értékre normáltuk. Az elméleti és gyakorlati számítások eredményét a 3.17. ábrán tüntettük fel. Látható, hogy a kiszámított elektrogenicitási értékek jól leírják a magas pH értékeknél az áramjelben jelentkező pozitív csúcsot (3.13. ábra).

3.3. Az M állapot újragélesztése



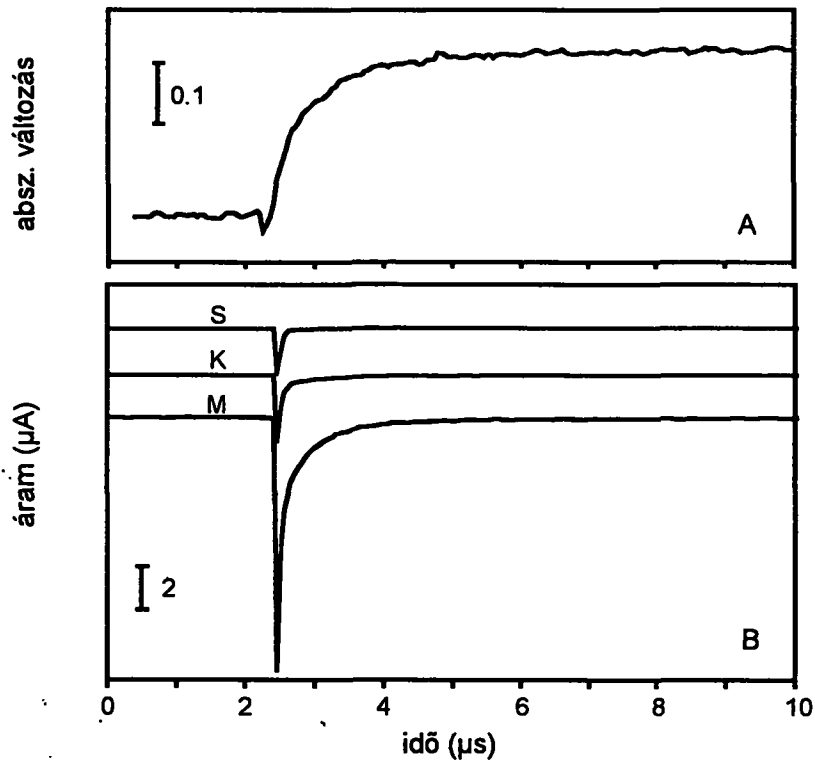
3.18. ábra. A D96N mutánsban mért differencia spektrumok. Mérési körülmények: 100 mM NaCl, 25 mM MES, 25 mM Tris pufferek, pH 8.0; 57 mW cm⁻² sárga háttérfény, gerjesztés 420 nm-en. Késleltetési idők: 0.2; 0.4; 0.6; 1; 2.5 és 6 μ s a nyíl irányában.

A D96N mutánsban, magas pH értéken, sárga háttérfény megvilágításnál a fehérje teljesen az M állapotba kerül. Ennek igazolására 570 nm hullámhosszon abszorpció kinetikai jeleket mértünk. A minta kifakulása 35 ms



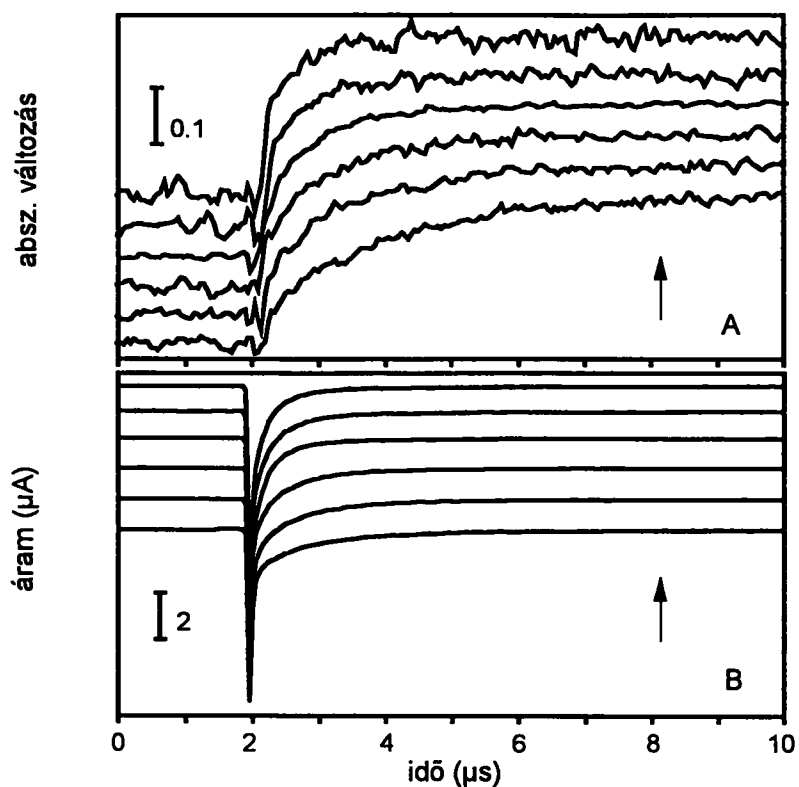
3.19. ábra. A D96N mutáns spektruma. A mérési körülmények azonosak a 3.18. ábrán leírtakkal. BR-háttérmegvilágítás nélkül; M-háttérmegvilágítással; M'- és BR'-köztes spektrumok, a 3.18. ábrán bemutatott differencia spektrumból számítva.

körüli időállandóval jelent meg. A kifakulás lecsengési ideje, a háttérfény kikapcsolása után, 5.6 s. A két időállandó aránya 160, értéke biztosított arról, hogy a minta a megvilágításkor valóban az M állapotban volt. 420 nm hullámhosszon gerjesztve a mintát, az OMA méréseket 200 ns–6 μ s késleltetési időkkel végeztük (3.18. ábra).



3.20. ábra. Abszorpció kinetikai (A) és elektromos (B) jelek. A mérési körülmények azonosak a 3.18. ábrán leírtakkal; S–590 nm gerjesztéssel, háttérmegvilágítás nélkül; K–420 nm gerjesztéssel, háttérmegvilágítás nélkül.

6 μs időig az 570 nm abszorpciójában növekedés jelentkezett, 6 μs és 1 ms késleltetéseknél a jelben változás nem volt észlelhető, hosszabb időeltolódásoknál a jel körülbelül 35 ms élettávval lecsengett (nincs ábra). Az SVD analízis a spektrumban két állapot jelenlétét mutatta ki. A köztes állapotokra való spektrum kereséssel a BR alapállapot spektrumán kívül (amit megvilágítás nélkül mértünk) és

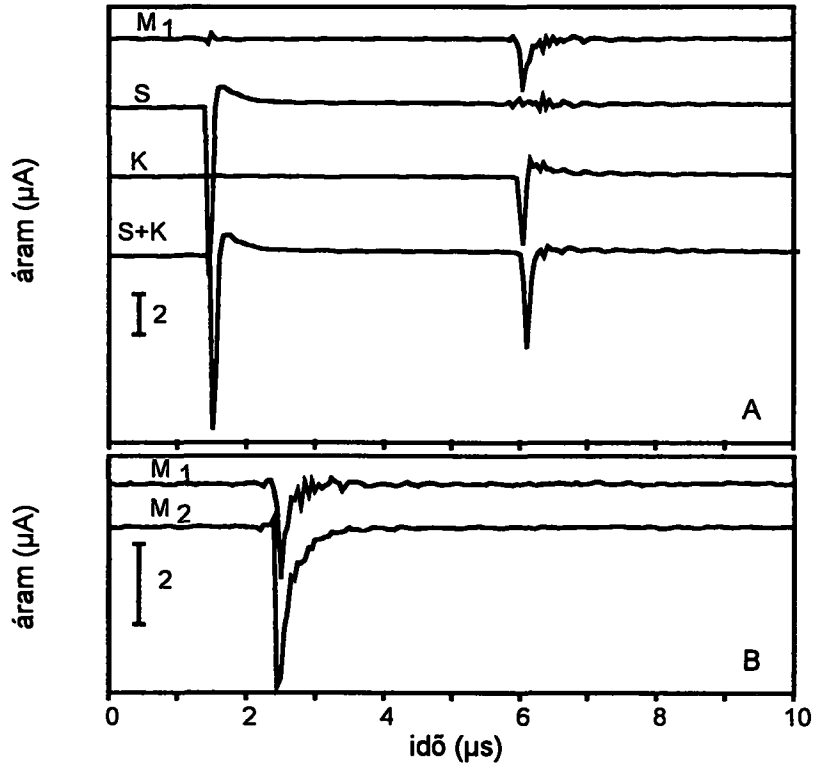


3.21. ábra. Abszorpció kinetikai (A) és elektromos (B) jelek. Mérési körülmények mint a 3.18. ábrán, különböző hőmérsékleteken: 5, 10, 15, 20, 25 és 30 °C fokon, a nyíl irányában.

a háttérmegvilágítással készült mérésből kapott M állapoton kívül, még két állapot jelenlétét mutattuk ki, amelyeket BR' és M' –vel jelöltünk (3.19. ábra).

A BR' spektrumát úgy kaptuk meg, hogy a kék fényel kigerjesztett M állapot mennyiségét (esetünkben 5.7 %) a 100 μs késleltetésnél kapott differencia spektrumhoz adtuk. Ha pedig a 200 ns késleltetésnél kapott jelhez adtuk, akkor a

jelben két csúcs jelent meg: az egyik 410 nm, a másik a 566 nm hullámhossznál. A második csúcs mutatja, hogy a BR' már eleve jelen volt. Ha úgy végeztük el a BR'



3.22. ábra. Vad típusú BR-en mért jelek. Mérési körülmények: 100 mM NaCl, 25 mM MES, 25 mM Tris pufferek, pH 9; S-590 nm gerjesztés; K-420 nm gerjesztés; S+K-5 μs időeltolódás a két gerjesztés között; M₁-az M₁ köztes állapotnak megfelelő jel, amit az első háromból számítottunk ki; M₂-hasonlóképpen számított jel az M₂ köztes állapotra, de 500 μs időeltolással az S és K jelek között.

spektrum kivonását, hogy az 566 nm csúcs eltűnjön, akkor megkaptuk az M' spektrumát. Az M' állapot a lézergyújtás után nagyon korán megjelenik és a BR' állapotba cseng le. Mivel háttérfényben a fehérje miliszekundumos időállandóval

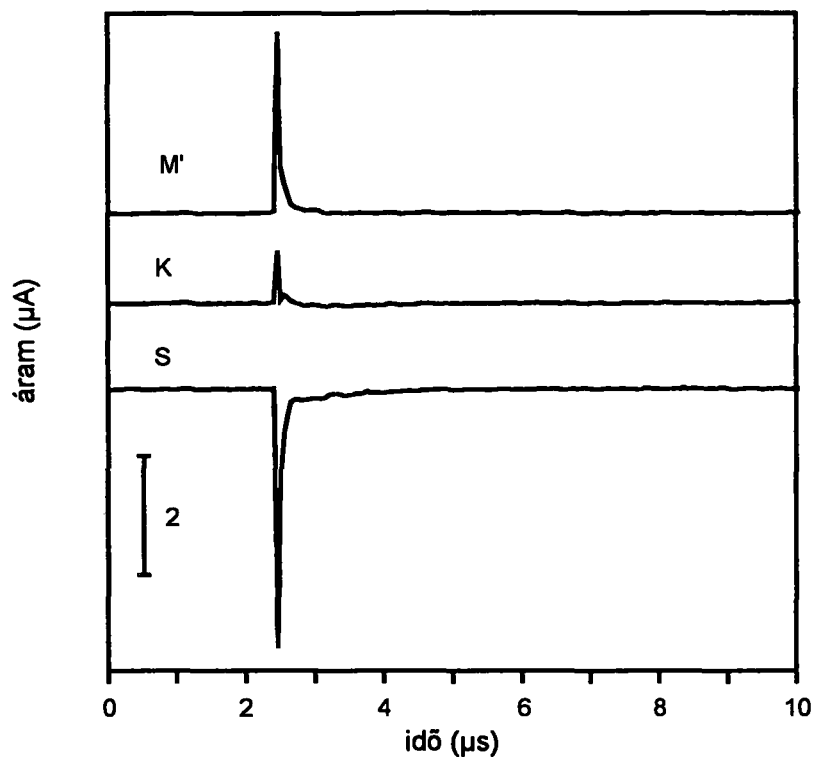
kerül az M állapotba a módszer nem alkalmas a BR' állapotnak a BR alapállapotba való lecsengésének követésére.

A D96N mutánsban az M állapot visszareakciójának kinetikáját abszorpció kinetikai és elektromos jelek mérésével határoztuk meg, 420 nm hullámhosszal való gerjesztésnél, sárga háttérfény bekapcsolása mellett (3.20. ábra, 3.20.(B) ábrán az M görbe). Az elektromos jelnek kontroll mérései: 590 nm (3.20.(B) ábrán az S görbe) és 420 nm (3.20.(B) ábrán a K görbe) hullámhosszal való gerjesztésnél mértük, háttérmegvilágítás nélkül. A háttérmegvilágítás nélkül készült jelek mindegyike a BR alapállapot gerjesztéséből származik, és van pozitív komponense a nagy negatív mellett. A két jelet megfelelő konstanssal való beszorzás révén lehetett egymásra normálni. Ez bizonyítja, hogy mindkét jel a BR alapállapotból származik. Az M állapot visszagerjesztéséből származó jelnek csak negatív komponense van, és két exponenciálissal illeszthető. Az abszorpció kinetikai és elektromos jelek hőmérsékletfüggésének tanulmányozását azért végeztük el, hogy az M köztes állapot fotociklusára jellemző termodinamikai paramétereket kiszámítsuk (3.21. ábra és 1. Táblázat).

1. Táblázat. A 20°C fokon meghatározott időállandók és a D96N mutáns abszorpció kinetikai és elektromos jeleinek (3.22. ábra) globális illesztéséből számított termodinamikai paraméterek. A hiba $\pm 10\%$.

τ (ns)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol K)	ΔG (kJ/mol)
190	53.8	91.5	26.9
860	44.9	47.9	30.8

A vad típusú BR mintában, az M köztes állapot visszareakciója elektromos jelének mérésére kettős gerjesztéses mérést végeztünk. A minta pH értékét 9-re állítottuk be. Az irodalom alapján (Hessling és mtsai. 1997) (Ludmann és mtsai. 1998) ez biztosítja, hogy 5 μ s késleltetésnél csak az M_1 állapot legyen jelen a mintában, 500 μ s késleltetésnél pedig csak az M_2 állapot. Ez a beállítás lehetőséget adott a két állapot közötti különbség detektálására. Az abszorpció kinetikai jelekből meghatároztuk, hogy a BR-ből 30%-ot gerjesztettünk ki az első impulzussal. Az M újragerjesztésére kapott elektromos jel elméleti kiszámítására (3.22.(A) ábra) a kettős gerjesztéses (S+K) jelből két jelet vontunk ki: 590 nm hullámhosszú fényel való gerjesztéssel kapott jelet (S), és a 420 nm hullámhosszú fényel való gerjesztéssel kapott jelet (K). A 3.22.(A) ábrán bemutatott jelek két gerjesztés közötti 4.5 μ s késleltetésnél készültek. A 3.22.(B) ábra a 5 μ s időeltolással kiszámított jelet (ami az M_1 köztes állapotnak felel meg)



3.23. ábra. A D85N mutánsban mért elektromos jel. Mérési körülmények: 100 mM NaCl, 25 mM MES, 25 mM Tris pufferek, pH 9. S, gerjesztés 590 nm; K, gerjesztés 420 nm; M', az előző két jelből lett kiszámítva.

és az 500 μ s időeltolással mért jelet (ami az M_2 köztes állapotnak felel meg) mutatja. Az M_1 köztes állapothoz tartozó jelnek gyorsabb lecsengése figyelhető meg a 3.22. ábrán.

A D85N mutáns pH 9 értéken protonátlan Schiff bázist jelző M – szerű állapotot tartalmaz 50%-ban (Turner 1993). A minta 590 nm hullámhosszal

való gerjesztése negatív jelet eredményez, aminek jellegzetes törési pontja van a $0.5 \mu\text{s}$ -nál (3.23. ábra S görbéje). Ez azt jelzi, hogy a jel legalább két komponenst tartalmaz. 420 nm hullámhosszal való gerjesztésnél az elektromos jel gyors része pozitív, míg a lassú komponense negatív (3.23. ábra K görbéje). pH 7 értéken ahol főleg bíbor állapot van jelen az 590 nm gerjesztéssel készült jel hasonló a pH 9-en készült jellel, ami az irodalomban előzőleg is ismert volt (G.J.Turner 1993, C.Gergely 1992). pH 7 értéken, 420 nm gerjesztésnél mért jel hasonló az 590 nm gerjesztésnél kapott jellel, de amplitúdója fele akkora (nincs ábra). pH 7 értéken mért jelek arányát használva, a K görbét az S-ből kivonva, az M-féle formához tartozó jelet sikerült meghatározni (3.23. ábra M' görbéje), ami egyetlen pozitív, gyors komponenst tartalmaz.

4. AZ EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA

4.1. Abszorpció kinetikai mérések:

A BR fotociklusát tanulmányoztuk a pH 4.5–pH 9.0 tartományban, mivel az alapállapot spektrumában lényeges változásokat előzőleg sem mutattak ki (Gergely és mtsai. 1997), és a kinetika egyetlen modellel való leírására nyílik alkalom. pH 4 érték alatt az Asp85 protonáltsága miatt (Váró és Lanyi 1989) az alapállapot spektruma a hosszú hullámhosszak felé tolódik, a fotociklus és a fehérje proton pumpáló aktivitása is megváltozik (Dér és mtsai. 1991). A köztes állapotok megjelenése (a jelek felfutása) nem változott pH 4 és pH 7 értékek között, de gyorsult, amikor a pH 7-ről pH 9-re emelkedett. Ez a gyorsulás a Glu204 titrálásának tudható be. pH 9 érték felett, a Glu204 titrálása heterogenitást idéz elő a mintában (Cao és mtsai. 1993), és a jelek lecsengése erősen lassul. Fontos itt megjegyezni, hogy a méréseink során is a pH 8.5 és pH 9.0 értékeknél kapott eredményeket már befolyásolta ez a jelenség. Az adatok négydimenziójú (idő, hullámhossz, pH, hőmérséklet) összegyűjtése és kétféle vizsgált jel (abszorpció kinetikai és elektromos jel) mérése hozzásegített a különböző fotociklus modellek komplex analíziséhez.

A K köztes állapot pH-függetlennek, az L, M és N állapotok kevésbé hőmérsékletfüggőnek, az O köztes állapot erősen pH- és hőmérsékletfüggőnek bizonyult (3.1. ábra, 650 nm-nél mért jelek, 3.3. ábra), ahogyan ezt előző munkák is bizonyították (Chizhov és mtsai. 1992). Míg az m1 modell független paramétereinek száma 13, az m2 modellé 12, addig az m3-as modell 20 független paramétert tartalmaz. Ez utóbbi modell az első két modell kombinációjából építhető fel. Egy komplexebb szekvenciális modellt is tanulmányoztunk, amely két N, illetve két O köztes állapotot feltételez (Zimányi és mtsai. 1993). A modellillesztés jóságát azonban nem javította és az Eyring ábrázolás nem volt lineáris. Az m1 modell alapján számolt sebességállandók Eyring ábrázolása minden pH értéknél lineáris függést mutatott. A sebességállandóknak az illesztéstől való eltérése $\pm 3\%$.

Az irodalmi adatokból tudjuk, hogy a fehérje feltekeredési folyamatokban, a hőkapacitás erősen hőmérsékletfüggő (az entrópia és entalpia a hőkapacitás függvényei), mivel nagy a felületi kötődésű vízmolekulák átrendeződése. Ekkor az Eyring ábrázolás görbül (Baldwin 1986).

A mi esetünkben, az m2 és m3 modellek alapján készített Eyring ábrán ha a nemlinearitás oka a hőkapacitás változása lett volna, mindkét esetben a protonfelvétel és protonleadás sebességállandói hasonló görbületet mutattak volna (nincs ábra). Ez az egyik lehetséges magyarázat, ami azonban kevésbé valószínű

mivel a BR olyan membránfehérje, amelyben a fotociklus során létezik a vízmolekulák helyi átrendeződése, de jóval kisebb mértékben, mint a fehérje feltekeredési folyamatokban.

Másik lehetséges magyarázat az, hogy különböző hőmérsékletek esetén energetikailag különböző átmenetek dominálnak. Az Eyring ábrázolás ekkor is nemlineáris (nincs ábra), ami jóval komplexebb fotociklus megrajzolásához vezet. Van egy harmadik lehetséges magyarázat is az Eyring ábrázolások nemlinearitására, éspedig az, hogy a párhuzamos elágazásokban, a hasonló átmenetek sebességállandói közeli értékeket mutatnak, ami oda vezet, hogy egy adott hőmérséklet esetében a reakció az egyik ágon megy végbe, míg egy másik hőmérséklet esetén egy másik ágon, és így egy összetett változás jön létre.

A párhuzamos modellekre felállított Eyring ábrázolás másik érdekes jellemzője az, hogy néhány sebességállandó esetén az illesztés negatív entalpia barriereket adott, aminek nincs fizikai értelme.

Következtetésképpen: a reverzibilis átmeneteket feltételező soros modellel dolgoztunk tovább, mert ez bizonyult olyan modellnek amely fizikailag értelmezhető.

pH 5 értéknél (3.5. ábra) a K és L köztes állapotok jelenléte a fotociklus végéig megfigyelhető. A sebességállandók pH függéséből látható (3.6. ábra), hogy ez az $M_2 \rightarrow M_1$ átmenet létezésének tulajdonítható. Hasonló

egyensúlyt fedeztek fel alacsony pH értéknél a D96N mutáns fotociklusában (Zimányi és mtsai. 1992a) és pK_a 5.8 -as értéket találtak az $M_2 \rightarrow M_1$ átmenet "befagyására". A vad típusú BR esetében pK_a 5 és pK_a 6 közötti értéket becsültünk (3.6. ábra).

pH 7 érték fölött, az $O \rightarrow BR$ átmenet "befagyott". Előző mérésekből ismert volt, hogy az $O \rightarrow BR$ "nem létezik" pH 6 érték alatt, csakis magas pH értékeknél játszik szerepet ez az átmenet (Váró és Lanyi 1990). Az ellentmondás annak tudható be, hogy bár a munka pH 7 értékre, 6 különböző hőmérsékletre vonatkozó adathalmazt mutatott be, időtartománya is közel azonos volt az általunk használttal, de a modellben még nem vették figyelembe az $M_2 \rightarrow M_1$ reakciót, a számítások nem készültek számítógépen és az N állapot energianívóját sem ismerték pontosan.

Kiszámítottuk az O állapotból a BR-be visszaalakuló bakteriorodopszin pH-függését: pH 6.5 alatt ez az érték az összBR ~ 30%-a; pH 7 érték fölött csökken és pH 8 fölött teljesen eltűnik (ahogyan a 3.6-os ábrán az $O \rightarrow BR$ sebességállandó görbéje változása mutatja). A 3.6. ábra kiemeli, hogy nincs olyan sebességállandó, amely folytonosan csökkenne a pH függvényében és amely a proton felvételnek tulajdonítható. Ez a tény bizonyítja, hogy a protonleadás és protonfelvétel nagyon fontos lépéseit a fehérjén belüli protonálható aminosavak határozzák meg (Balashov és mtsai. 1996).

A reverzibilis átmeneteket feltételező szekvenciális modellel készült adatanalízis a tanulmányozott pH tartomány egészére egységes energetikai leírást adott. Az $M_2 \rightarrow M_1$ visszareakció figyelembevételkor az egész jelenségre vonatkozó energetikai kép megrajzolására sor kerülhetett pH 6-os értékig (3.8.(A), 3.9.(A) és 3.10.(A) ábrák). A szabadenergia két fontos változást mutat: az M_2 eltolódását, ami a két M állapot visszareakcióját befolyásolja; valamint magas pH értékeknél az N állapot eltolódását, a körülötte levő barrierek eltolódása formájában. Ez utóbbi eltolódás miatt, a fotociklus lassúbbá válik, az N állapot felhalmozódik, az M_2 állapot pedig hangsúlyozottabban sokfázisúan cseng le. A kisebb szabadenergia növekedés az L és M_1 köztes állapotok között, az M_1 állapot felhalmozódását vonja maga után, ahogyan az a koncentráció változásokban is nyomon követhető (3.5. ábra, pH 9.0). Ez a tény az Asp85 pK_a -jának növekedésével hozható kapcsolatba, amikor a Glu204 deprotonált állapotban van, és sokkal hatékonyabb proton átadást segít a Schiff bázistól az Asp85-ig (Balashov és mtsai. 1996).

Előzőleg az M_1 és M_2 közötti átmenetet, mint entrópia-csökkenéssel járó lépést tekintették (Váró és Lanyi 1990). Alacsony pH értékeknél ez az átmenet reverzibilis, magas pH-ra való extrapolálása pedig az M_1 és M_2 közötti átmenet entrópiánövekedéssel járó tendenciáját mutatja (3.11. ábra). Nem tudunk egyértelmű választ adni a saját eredményeink és más kutatócsoportokban (Ort és

Parson 1979a) elért eredmények közötti különbségre, de az biztos, hogy a különböző mérési technikákban keresendő a válasz. A fentebb említett munkák esetén fotoakusztikus módszereket használtak, ahol nem lehet különbséget tenni a fehérje és környezete közötti, hőcsere okozta térfogatváltozás, és a fehérjében magában történő térfogatváltozás között. A mérési rendszer időfelbontása nem terjedt ms alá, az eredményeket viszont exponenciálissal illesztették. Az entrópiánövekedés a fehérje konformációs szabadságához való hozzájárulást jelenti, és a két M állapot közötti konformációs változáson túl, a kristályszerkezet merevségből való fellazulása eredményezi.

A retinálok közötti exciton kölcsönhatás megszűnése, ami a retinál orientációjában létrejövő rendezetlenséget mutatja, és amelyet cirkuláris dikroizmus-mérésekkel mutattak ki (Draheim és Cassim 1985, Zimányi és mtsai. 1987), megmagyarázható eredményünk alapján.

A pH növekedésével létrejövő entrópiánövekedés és entalpiacsökkenés, a két M állapot között, a szabadenergia csökkenésében nyilvánul meg (3.11. ábra), ami a mozgató rugója a fotociklusnak a későbbi lépések felé, és ami egyirányúvá teszi az átmenetet pH 6 fölött. A két M állapot közötti szabadenergia változás a proton kilépésében létrejövő változáshoz kapcsolódik (Zimányi és mtsai. 1992b). A fotociklusnak ezen a pontján a fehérje kinyílása energetikailag alátámasztott.

Egy másik nagy entrópiánövekedés észlelhető a pH növekedésével, az N és O állapotok között (3.11. ábra). Ez további fehérje-kinyírást mutat, amit ezúttal entalpiánövekedés kísér, és ami végül szabadenergia növekedést eredményez az N és O között, az O állapot eltűnését eredményezve magas pH értékeknél. Az entalpiánövekedés az entrópiánövekedésből származó konformációs energia csökkenését egyensúlyozza. Hasonló eredmény született abszorpció kinetikai mérésekből és hőmérséklet ugrásos módszerekből (Chizhov és mtsai. 1992).

A fehérje energia-diagramja (3.8. ábra) mutatja, hogy minden eddig felsorolt változást az N állapot szabadenergia szintjének az M_2 -hoz és O-hoz viszonyított csökkenése okozza. Az M_2 és O állapotok szintje majdnem változatlan marad. Ám bár az N állapot entrópiánívója nagyobb az M_2 -énél, pH 5-ön, magas pH értékeknél ez az érték kisebb lesz (3.10. és 3.11. ábrák).

Több aminosav is van, amelyek a protonszállításában fontos szerepet játszanak, titrálódásuk nagy szerepet játszik a kinetikai változásokban. Az irodalomban leírt pK_a értékeknek a sebességállandók pH-függésével és az energia diagramokkal való összehasonlítása bizonyítja, hogy az Asp85 és Glu204 komplex titrálódása az irodalomban leírt pK_a értékekhez közeli érték (Balashov és mtsai. 1996). A konformációs változásokat, más faktorokon kívül, e két aminosav protonációs állapota is befolyásolja. Az $L \rightarrow M_1$ átmenetben az Asp85 a Schiff

bázistól protonálódik, ami a Glu204 deprotonálódását vonja maga után semleges és magas pH értékeknél (Zimányi és mtsai. 1992a). pH 9 fölött, a Glu204 a BR alapállapotában deprotonált. pH 6 alatt, ahol a Glu204 nem tud deprotonálódni, a protonleadás később történik, egyenesen az Asp85-től (Zimányi és mtsai. 1992a).

Az M₂ állapot utáni lépésekben nagy térfogat változások már nem észlelhetők (Lanyi és Váró 1995). A kinyírást, ami a citoplazmatikus oldalról valószínű (Subramaniam és mtsai. 1997) megfelelő térfogat csökkenés kell, hogy kísérje az extracelluláris oldalon. A pH emelkedésével, az extracelluláris oldalon lévő Asp85, a Glu204 negatív töltésében létrejövő változáson keresztül lassítja a reizomerizációt, ami az O kialakulásához szükséges. Az egyik töltés semlegesítésének az O kialakulását kellene serkentenie, ahogyan az E204Q mutáns tanulmányozásakor bebizonyosodott (Brown és mtsai. 1995).

Az O lecsengését szintén az Asp85 és Glu204 aminosavak protonáltsága határozza meg (Richter és mtsai. 1996). Az L93A mutánsban hasonlóképpen felhalmozódik az O állapot (Subramaniam és mtsai. 1997).

A jelen dolgozat eredményei alátámasztják az eddigi megfigyeléseket.

4.2. Elektromos jel mérések:

Az abszorpció kinetikai és elektromos jelek együttes mérése (3.12. ábra) gél mintákon lehetséges és lehetőséget ad az elektromos jelek és a fotociklus köztes állapotai közötti korreláció felállítására. Az áram- (3.13. ábra) és feszültség (3.14. ábra) jelek pH-függése mutatja, hogy a fehérjén belüli töltésmozgások erősen pH-függőek. Lassabb időtartományban a feszültség jel már nem változik jelentősen, de az észlelhető, hogy jellege folyamatosan átalakul. A jelek egyidejű illesztése (3.15. ábra) a köztes állapotok elektrogenicitásainak kiszámítását teszi lehetővé. Az N állapoton kívül minden köztes állapot pH-függetlennek bizonyult, hibán belül (3.16. ábra). Tehát a tanulmányozott pH tartományban az elektrogenicitások nem titrálódnak. Ez arra utal, hogy a szállított protonon kívül, a töltésmozgások a fehérje belsejében lévő aminosav oldalláncoktól származnak, vagy több olyan, a proton csatornán belül található, kötött víz molekula orientációjától, amelyek nem közelíthetők meg direkt módon a vizes fázisból.

A fotociklus első köztes állapotainak vizsgálata, amely a D85N, D212N és D96N mutánsokon készült, hasonló értékeket adott a K, L és M₁ állapotok elektrogenicitásaira és azt is megmutatta, hogy azok pH-függetlenek (Gergely és mtsai. 1993). Az első lépésekben, a K állapot eléréséig a retinál

mentén történő töltés-szétválasztás és az *all-transz* \rightarrow *13-cisz* izomerizáció következik be (Chang és mtsai. 1985). Az első negatív elektrogenicitás ezeknek a folyamatoknak tulajdonítható. Az L állapotban, a fehérjében lokális relaxáció észlelhető (Lohrmann és Stockburger 1992), amely néhány oldalláncot is magába foglal. Az L \rightarrow M₁ átmenet a Schiff bázistól az D85-höz történő aktív proton transzlokációt takarja (Butt és mtsai. 1989) és pozitív elektrogenicitást ad az M₁ köztes állapotra. Az M₁ \rightarrow M₂ átmenet a fehérje egyik konformációs változásának helye, ami az F és G hélixek membránnal majdnem párhuzamosan történő beállításában nyilvánul meg. Ezzel együtt a pozitív töltés extracelluláris térrészbe való szállítása valósul meg, ami az M₂ állapot pozitív elektrogenicitásában mutatkozik meg. Ez a protonnak az útján való mozgásából és a konformációs változás alatt létrejövő töltésmozdulásnak a membrán normálisára történő vetületéből tevődik össze.

Az irodalmi adatok szerint nemcsak az M, de az L, N és O köztes állapotoknak is léteznek alállapotai (Zimányi és Lanyi 1993). A jelen munkában ezeket a „spektroszkópiailag megkülönböztethetetlen” átmeneteket nem vettük figyelembe, így az elektrogenicitások kiszámításakor a köztes állapotok teljes elektrogenicitását kaptuk meg. Az M \rightarrow N \rightarrow O átmenetek alatt két fontos lépés valósul meg: a Schiff bázisnak D96-tól való reprotonálódása, valamint az D96 protonfelvétele a citoplazmatikus csatornában (Zimányi és mtsai. 1993).

Az O állapot elektrogenicitása jelentősen nagy érték és pH-független. Alacsony pH értékeknél, ahol nincs N, de sok O van jelen a fotociklusban, a D96 kis távolságról reprotonálódik és a fotociklus sebességét meghatározó lépés a retinál reizomerizációja.

Magas pH értékeknél, a reprotonálódás az N állapot lefolyása alatt történik, az O állapot már nem detektálható kinetikailag a fotociklusban, ami azt jelzi, hogy a sebességet meghatározó lépés szoros összefüggésben van a fehérje protonszállító mechanizmusával. pH 6 körül, az N és O köztes állapotok jelen vannak a fotociklusban de alacsony koncentrációban. Az utolsó két köztes állapot illesztése az elektromos jelben eléggé nagy hibával történik, ha a koncentrációk alacsonyak (lásd az O elektrogenicitását az 16. ábrán). Az N állapot kis elektrogenicitását az O állapot magas elektrogenicitása ellensúlyozza. Az N állapot elektrogenicitása erős pH-függést mutat.

A pH növekedésével a proton környezetből való felvételének lehetősége erősen csökken. A proton egyre távolabbi helyről kell, hogy a citoplazmatikus csatornába kerüljön. Innen is látszik, hogy nincs jól meghatározott proton donorja a D96-nak, a konformációs változások és a citoplazmatikus csatorna elérhető protonjai változtatják a D96 hozzáférhetőségét (Zimányi és mtsai. 1993).

A D96N mutánsban, ahol a proton donor hiányzik, a Schiff bázis reprotonálódása pH-függővé válik, a reprotonálódás folyamata pedig hasonlít az D96 aminosavnak a vad típusú BR-ben való reprotonálódási folyamatához. A D96N mutánsban, az M_2 elektrogenicitása pH-függővé válik (Gergely és mtsai. 1993). Ez a citoplazmikus félcsatornában, a fehérje konformációs változásai alatt bekövetkező, vízmolekula vagy aminosav oldallánc protonáltsági állapotának pH függését mutatja. Az N állapot elektrogenicitásának pH függésére vonatkozó másik lehetséges magyarázat, hogy két, kinetikailag erősen átfedő N állapot létezik a fehérje különböző protonáltsági fokával (Zimányi és mtsai. 1993). Méréseink kiértékelésekor csak egy N állapotot vettünk figyelembe. A pH növekedésével, a két állapot közötti egyensúly változik meg, ami az N állapot teljes elektrogenicitásának megváltozását vonja maga után.

A fotociklus végén a fehérje visszatér alapállapotába. Az ionerősség állandó a szuszpenzióban, a membrán vastagsága nem változik. A BR elektrogenicitását kizárólag a protonnak a citoplazmikus oldalról az extracelluláris tér részbe való szállítása határozza meg, ami a membrán fentebb említett állandó vastagsága mellett, állandó kell maradjon, olyan eredmény ez, amelyet a számításaink is alátámasztottak (3.16. ábra).

Az elektrogenicitás értékek megbízhatóságának ellenőrzése: a kiszámított feszültség értékek illesztése a kísérleti eredményekhez (3.15.(C) ábra)

és az elméletileg kiszámított 250 ns-os áramjelek illesztése a kísérleti eredményekhez. Fontos megjegyezni, hogy az elektrogenicitásnak semmiféle pH függését nem kell figyelembe venni, mivel a kinetikai állandók a teljes effektust jól leírják.

4.3. Az M állapot újragélesztése:

A D96N mutáns M. köztes állapotának abszorpciós maximuma, melyet háttérmegvilágításos kísérletünkben kaptunk, 402 nm, ami megegyezik az irodalmi adatokkal (Zimányi és mtsai. 1993). A BR folyamatos megvilágításakor a fotociklus leglassabban lecsengő köztes állapota, az M_2 állapot halmozódik fel. A Schiff bázis deprotonálódása után a fehérje konformációja megváltozik, extracelluláris konformációból citoplazmatikus konformációba megy át (Zimányi és mtsai. 1993). A D96N mutáns spektruma (3.19. ábra), amelyet a gerjesztés után felvett differencia spektrumból számítottunk ki, egy gyorsan megjelenő (M') köztes állapotot mutat, 412 nm abszorpciós maximummal, valamint egy másik hosszú életű köztes állapotot, 566 nm abszorpciós maximummal (BR'). Ez utóbbi köztes állapot lecsengési ideje a szekundumos időtartományban van.

Az M köztes állapot elektromos jele a D96N mutánsban csak negatív összetevőket mutat (3.21.B. ábra), ahogyan ez a vad típusú BR-ben már ismert volt (Ormos és mtsai. 1980). A BR fotociklusában az M állapot kialakulásakor a teljes töltésmozgás pozitív (Keszthelyi és Ormos 1980). Az M állapot gerjesztésekor a töltés az eredeti helyére lép vissza, vagyis a Schiff bázis reprotonálódik. Az M köztes állapot újragerjesztésére végzett abszorpció kinetikai és elektromos mérések feldolgozásánál (3.21. ábra) két exponenciális globális illesztést végeztünk. A jelek hőmérsékletfüggéséből (3.22. ábra) kiszámítottuk az átmenetek termodinamikai paramétereit (1. Táblázat).

2. Táblázat. Az M állapot újragerjesztésével kapott időállandók. Az illesztés hibája $\pm 10\%$.

Törzs	1. exp. τ (ns)	2. exp. τ (ns)
D96N	190	860
D85N	150	-
BR, M ₁	130	-
BR, M ₂	240	-
BR, M ₁ és M ₂	60	300

Az eredmények alapján olyan fotociklust állítottunk fel, amelyben az M állapot után két köztes állapot van jelen. Az M állapot, a kék fény elnyelése után az M' állapotba megy át és visszavéve az előzőleg leadott protont a BR'

állapotba cseng le. A BR' állapot a BR állapottól konformációban és energiatartalomban különbözik. A BR' állapot lassan cseng le és a fehérje visszatér eredeti állapotába, eredeti konformációjába.

Karakterisztikus különbség van az M_1 és M_2 fotoreakciók életideje között, ahogy az a vad típusú BR-en mért jelekből látható (3.23.(B) ábra). Az M_2 állapotra kapott életidő megegyezik a D96N mutánsban mért M állapot életidejével (lásd a 3.20. ábra M görbáját és a 3.22. ábra M_2 görbáját).

A vad típusú BR-en mért elektromos jelek nagy zaja miatt elég volt egyetlen exponenciálissal illeszteni, de a két exponenciális illesztést is elvégeztük (2. Táblázat): Az egyetlen exponenciálissal illesztett jelből kiszámított életidő az irodalmi adatokkal jól egyezett (FTIR mérésekből kapott eredmények)(Hessling és mtsai. 1997), és ezek az eredmények alátámasztották a két M köztes állapot különbözőségét. A két időállandó közötti különbség azt mutatja, hogy az M_1 állapotban a fehérje extracelluláris konformációban van, a proton könnyebben eléri a Schiff bázist mint az M_2 állapotba való fordulás után, amikor a fehérje már citoplazmatikus konformációban van. Mindkét esetben, az elektromos jelek előjeléből nyilvánvaló, hogy a protonfelvétel az extracelluláris térből történt.

Lipid-impregnált lapokra adszorbeált PM-eken végzett mérések két köztes állapot jelenlétét mutatták (Dickopf és Heyn 1997). A méréseink alapján a

két M köztes állapot kétexponenciális globális illesztését elvégezve hasonló eredményt kaptunk.

A D85N mutánsban, magas pH értéknél, egy M-szerű forma alakult ki, protonátlan Schiff bázissal. A jel, amelyet ennek az M formának a gerjesztésekor kaptunk, ellentétesnek bizonyult a vad típusú BR-ben illetve a D96N mutánsban mért jelekkel: nem volt negatív komponense, egyetlen exponenciálissal lehetett illeszteni. Időállandója nagyon hasonló a vad típusú BR -ben az M₁ állapotra kapott értékkel, ami azt is mutatja, hogy a Schiff bázis könnyen hozzáférhető a leadott proton számára. Előző tanulmányokból ismert, hogy a fehérje citoplazmatikus konformációban van (Kataoka és mtsai. 1994); az elektromos jel előjele mutatja, hogy a protonleadás és a protonfelvétel a citoplazmatikus oldalon történt (Dickopf és mtsai. 1995). A kísérletek a Schiff bázis reprotonálódására egy több miliszekundumos életidejű kék köztes állapot megjelenését támasztják alá (Kataoka és mtsai. 1994; Dickopf és mtsai. 1995); rámutatnak egy gyors életidejű köztes állapot létezésére, amely megelőzi a kék köztes állapotot (Kataoka és mtsai. 1994). Ugyanebben a munkában egy korán megjelenő, 450 nm maximummal rendelkező köztes állapotról számolnak be.

A spektrum alapján elmondhatjuk, hogy ennek a köztes állapotnak nem lehet protonált Schiff bázisa, ami ellentmond az általunk mért eredményeknek, mivel a gyors lépés a Schiff bázis reprotonálódásának kell megfeleljen és a gyors

elektromos jel megjelenését kell vonja maga után. A kék köztes állapot megjelenésének ideje megfelel a proton felvétel életidejének (Dickopf és mtsai. 1995), ami arra utal, hogy a protonfelvétel meghatározhatta a köztes állapot megjelenését. A D96N és a D85N mutánsokban az M állapot újragenerjlesztésekor, valamint a vad típusú BR-ben az M₂ állapot újragenerjlesztésekor, a fehérje citoplazmatikus konformációban volt, de csak a D85N mutáns esetében történt protonfelvétel erről az oldalról. Minden esetben a protonfelvétel arról az oldalról történik, ahol a protonleadás bekövetkezett.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A bakteriorodopszin, mint proton pumpa energetikájának és töltésmozgásainak leírására abszorpció kinetikai, elektromos jel és újragéjesztéses méréseket végeztem pH 4.5–9 valamint 5–30 °C hőmérséklet tartományban. A méréseket bakteriorodopszint tartalmazó bíbormembrán fragmentumokból készített poliakrilamid gél mintákon végeztem. Az elektromos jel mérésekhez orientált gél mintákat készítettem. A mérések kiértékelése számítógépen történt, az SZBK Biofizikai Intézetében készített programok segítségével, valamint előző spektroszkópai mérések alapján számolt, a bakteriorodopszin fotociklusára vonatkozó adatok felhasználásával.

A széles pH és hőmérséklet tartományokban készült mérések alapként szolgáltak a bakteriorodopszin energetikai képének megrajzolásához és az energiaátadás folyamatának feltárásához.

A méréseim során kapott legfontosabb eredményeim:

- Bebizonyítottam, hogy a BR fotociklusának termodinamikai leírása a reverzibilis reakciókat feltételező szekvenciális modellel összhangban áll a különböző párhuzamos modellekhez képest. Részleteket fed fel a köztes állapotok

kialakulásáról és lecsengéséről, és arra is választ ad, hogy a pH változásával hogyan változik a köztes állapotok mennyisége (**Ludmann és mtsai. 1998a**).

- Megerősítettem azt az előzetes megfigyelést, mely szerint a gerjesztett állapotban, a retinában tartálékolt energia a fotociklus során több átmenetben disszipálódik: az $M_1 \rightarrow M_2$ és az $N \rightarrow BR$ illetve $O \rightarrow BR$ átmenetben. Az átmenetekre jellemző, hogy a ΔG értéke alig változik. Az M_1 állapotig a gerjesztésből származó energia teljesen a retinán van. Csak az $M_1 \rightarrow M_2$ átmenetben disszipálódik, és később, az $N \rightarrow BR$ illetve $O \rightarrow BR$ átmenetben a fehérje konformációs felazulását eredményezi, mielőtt az eredeti állapotába áll vissza (**Ludmann és mtsai. 1998a**).
- A bakteriorodopszin termodinamikai leírása alapján megállapítottam, hogy a fotociklus második felében két nagy konformációs változás következik be. Ha kicsi a protonkoncentráció, az $M_1 \rightarrow M_2$ átmenet a fotociklus egyirányúságát és az átfordulás valószínűségét növeli. Ezt a fehérje az M_2 szabadenergia szintjének csökkenésével éri el, amit entrópiánövekedés és konformációs lazulás kísér. Az O köztes állapotban más konformációs változás azonosítható, ami szabadenergia növekedéssel jár együtt ami az O állapot magas pH értékeknél való megjelenését gátolja (**Ludmann és mtsai. 1998a**).

- Kimutattam, hogy a reverzibilis reakciókat feltételező szekvenciális modell a tanulmányozott pH és hőmérséklet tartományban az elektromos jelek illesztésére is alkalmas (**Ludmann és mtsai. 1998b**).
- Bebizonyítottam, hogy a köztes állapotok elektrogenicitása, az N állapot elektrogenicitását kivéve, pH-független. Ez azt mutatja, hogy a fehérjén belüli töltésmozgások a proton transzport lépései alatt ugyanazok az egész pH tartományban. A köztes állapotok közötti átmenetek során bekövetkező töltéselmozdulások pH-függetlenek. Ez egy újabb, indirekt bizonyíték a tanulmányozott modell érvényességére (**Ludmann és mtsai. 1998b**).
- Kimutattam, hogy bár az elektromos mérések nem adnak pontos leírást a protonleadás és protonfelvétel lépéseiről, de a protonnak a membrán egyik oldaláról a másikra való szállítása jól meghatározott lépésekben történik (**Ludmann és mtsai. 1998b**).
- A D96N és D85N mutánsokon végzett kísérletek alapján sikerült az M állapot két alállapotának tanulmányozása és megkülönböztetése. Következtetéseket vontam le a fehérje konformációjára és a protonleadás és protonfelvétel

lépéseinek meghatározására vonatkozólag. A mutánsokon végzett kísérletekből megállapítottam, hogy az M visszareakciója alatt a fehérje citoplazmatikus konformációban van, de egyedül a D85N mutáns esetében történik erről az oldalról a protonfelvétel (**Ludmann és mtsai. 1999**).

- A vad típusú bakteriorodopszin kettős gerjesztéses módszerrel végzett mérései alkalmasnak bizonyultak az M állapot két alállapotának feltérképezésére és annak megállapítására, hogy az M állapot két alállapotának jelenlétében a fehérje két különböző konformációban van jelen. Minden kísérlet esetében megállapítottam, hogy a proton a fehérje azon oldalán kerül felvételre, ahol előzőleg a protonleadás történt (**Ludmann és mtsai. 1999**).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetem dr. Váró Györgynek, munkavezetőmnek, az évek során irántam tanúsított türelméért és odafigyeléséért, amivel munkámat irányította, tudományos gondolkodásomat formálta, itteni életemet figyelemmel kísérte.

Köszönöm dr. Ormos Pál akadémikusnak, a Biofizikai Intézet igazgatójának, hogy segítette ittmaradásomat és figyelemmel kísérte a munkámat.

Ezúton köszönetet mondok a Magyar Tudományos Akadémiának, hogy *Fiatal Kutatói* állásban részesülhettem és munkámat e szerződés keretében végezhettem.

Kollaborációim során együtt dolgoztam Ganea Constantával, Báthoriné Tárczy Zitával és Grazyna Ibronnal, akiknek ezúton megköszönöm, hogy tanítottak és segítettek a munkámat.

Szeretném megköszönni a Biofizikai Intézet dolgozóinak, elsősorban a Membránbioenergetikai csoport tagjainak, hogy türelemmel és szeretettel viseltettek irántam.

Kissné Domonkos Mária és Hegedűs Éva laboránsoknak külön köszönöm, hogy labormunkákban mindig szeretettel és segítőkészen fogadták kérdéseimet, kéréseimet.

Utoljára de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családom minden tagjának, vőlegényemnek és közeli barátaimnak türelmüket, szeretetüket és buzdításukat.

ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

THE ENERGETICS AND CHARGE MOVEMENTS OF A PROTON PUMP

I. INTRODUCTION

Bacteriorhodopsin (BR) is the simplest known active membrane transport protein. This light driven proton pump form trimers in two-dimensional hexagonal crystalline lattice in the cell membrane of *Halobacterium salinarum*. The 248 amino acids form 7 membrane-spanning α helices perpendicular to the membrane surface. The structure of the protein was resolved to less than 0.3 nm and lately refined to 0.15 nm. The chromophore is in the middle of the 4.9 nm thick membrane, dividing the protein in two proton transporting channels: the cytoplasmic and the extracellular half-channel.

At light excitation the protein goes through several intermediate states, denoted as K, L, M, N, O and back to BR and consequently a proton is transported to the extracellular phase. The process can be repeated with new flashes of light and this cycle is called the photocycle of BR. My study was limited to models generally used in the literature: the sequential model with reversible reactions between the intermediates; the two parallel reactions with unidirectional reactions and a generalization containing both models, involving two parallel branches with reversible reactions between the intermediates. From absorption kinetic data one can calculate rate constants that belong to the formation and decay of the intermediate states. The electric signal measurements helped to collect information about the steps of charge movement during the proton transport. The aim of my work was to perform both optical and electric signal measurements, on wide pH and temperature range, and calculate the thermodynamic parameters: activation enthalpy, entropy and free energy. Then to map the energetics of the protein and find a single model that can describe the proton transport process.

II. MATERIALS AND METHODS

Purple membranes were isolated from *Halobacterium salinarum* strain S9 by a standard procedure. J. K. Lanyi kindly supplied the mutants D85N and D96N expressed in strain L-33. The isolated purple membranes were embedded in polyacrylamide gel. The sample was kept overnight in the bathing

solution to equilibrate the pH and salt concentration gradients. Optical absorption kinetic data were recorded at five wavelengths (410, 500, 570, 610 and 650 nm) after laser excitation of the light-adapted sample, on a logarithmic time scale covering the interval from 300 ns to 0.5 s. The measurements were performed at six temperature values between 5 and 30 °C, at every half pH unit from 4.5 to 9. Excitation was performed with an excimer laser-driven dye laser, $\lambda = 590$ nm.

In the experiments performed with background illumination a mercury lamp was used, with a heat filter and a low cut-off glass filter, giving an irradiance of 57 W/cm² in the spectral range 500-800 nm. To excite the intermediate M, an excimer laser pumped dye laser was used, $\lambda = 420$ nm. In the double-flash experiments, the first flash was given by the excimer laser pumped dye laser, $\lambda = 590$ nm and the second pulse by a nitrogen laser pumped dye laser, $\lambda = 420$ nm. The delay between the two lasers was set by a home made timer. Time-resolved spectroscopy, with a gated OMA, provided difference spectra at various time points during the photocycle, as described elsewhere. Singular value decomposition (SVD) of the spectra and the global fitting of the absorption kinetics were performed with the program SPSEV. The extinction coefficients of the intermediates at the measured wavelengths were determined, using the earlier published spectral data. The model fitting to the data was performed with the program RATE. The thermodynamic parameters of the transitions were determined from the temperature dependencies of the rate constants, by using the program EYRING. From the electric signal measurements the electrogenicity of the intermediates was calculated. The fit of the electric signals was carried out in the MATLAB program.

III. RESULTS AND DISCUSSION

1. Absorption kinetic measurements

The study of the BR photocycle was restricted to the pH interval 4.5-9, and temperature range of 5-30 °C. The overall 25 °C increase of temperature gave the possibility to calculate the thermodynamic parameters (Ludmann és mtsai. 1998a). The rise part of the photocycle did not change at low pH but it became faster when the pH was raised from 7 to 9. Raising the pH from 4.5 to 7, the decay part of the signals was accelerated; from pH 7 to 9, the decay of signals became slower. The amplitudes of the signals were not strongly temperature-dependent, and the decay of the signal measured at 650 nm, characteristic of intermediate O, revealed strong temperature dependence of this intermediate. The Eyring plot of the rate constants for the sequential model with

reversible reactions at every pH value gave a linear dependence. There are three strongly temperature-dependent transitions in the second part of the photocycle: the reactions N to O, N to BR and O to BR. Up to pH 6, when the existence of the M_2 to M_1 back-reaction was taken into account, the overall energy picture of the photocycle could be calculated. The free energy indicates two important changes, a downshift of M_2 , preventing the back-reaction between the two intermediates M, and at higher pH values a downshift of intermediate N, with an increase in the barriers around it. Because of this latter change, the photocycle becomes slower, intermediate N accumulates and M_2 decays with a more accentuated multiphasic character. A smaller free energy decrease between the intermediate L and M_1 leads to the accumulation of intermediate M_1 in a larger amount, as observed in concentration changes. The transition M_1 to M_2 was earlier regarded as an entropy decrease step but in my study at pH above 6 an entropy increase during the M_1 to M_2 transition could be observed.

The entropy increase mean an addition to the conformational freedom of the protein leading to a decrease in the rigidity of the crystalline structure. The increase in the entropy and the decrease in the enthalpy, between the two intermediates M as the pH is increased results in a free energy decrease, which gives the driving force of the photocycle towards the later steps, making the transition unidirectional above pH 6. The opening of the protein is energetically favored at this stage of the photocycle. Another large entropy increase, as the pH is raised, could be observed between the N and O intermediates. This mean a further opening of the protein, but this was now accompanied by an enthalpy increase, which results in a free energy increase leading to the disappearance of intermediate O. The energy picture of the protein reveal that all these changes are caused by a decrease in the free energy level of N as compared to M_2 and O. The relation of M_2 and O remains almost unchanged. While the entropy of the intermediate N is larger than that of M_2 at pH 5, at higher pH values it becomes smaller.

It could be concluded that the excitation energy stored on the retinal, is given step-by-step to the protein, first to the counter ions, amino acids around the retinal and later to the whole protein. These steps are the same at all pH values, but with different time constants.

The thermodynamic treatment of the BR photocycle favored the sequential model with reversible reactions as compared to the different parallel models. So a unique model could be found to describe all the changes within the limits of the chosen pH and temperature interval.

2. Electric signal measurements

Electric signal measurements were performed in the pH range 4.5-9 at 20 °C (**Ludmann és mtsai. 1998b**). Absorption kinetic measurements were performed as well and the calculated concentrations of the intermediates were used to fit the electric signals and determine the electrogenicity of each intermediate. During the data processing the sequential model with reversible reactions was considered.

While the fast part of the signal is better characterized by the current signal, the slow charge motions give larger contribution to the integral of the current signal, the voltage signal. Above pH 7, a characteristic peak appears in the current signal in the hundred ns time interval. In this time domain, there is no large change in the absorption kinetic signals, only an acceleration of the rise of the intermediate M can be observed. In the voltage signal, the negative phase disappears earlier, with increasing pH, and the late part of the voltage signal rises slower, as the whole photocycle becomes slower. At longer times the voltage signal does not change dramatically, but can be observed to alter continuously.

Except for the intermediate N, all the electrogenicities were pH independent, within the error of calculation. In the early steps, up to intermediate K, a charge separation along the retinal and the *all-trans* to *13-cis* isomerization occur. During the L intermediate, a local relaxation of the protein is observed, involving some charged side chains resulting in negative electrogenicity. The L to M₁ transition contains an active proton translocation from the Schiff base to the proton acceptor Asp-85, giving a positive electrogenicity for intermediate M₁. The M₁ to M₂ transition is considered as a conformational change of the protein and there is a total shift in the positive charge toward the extracellular side of the membrane, resulting in the positive electrogenicity of intermediate M₂. The transition through intermediate M to intermediates N and O contains two major steps: the reprotonation of the Schiff base from Asp-96 and the proton uptake step from the cytoplasmic side of the membrane to Asp-96. The very low electrogenicity of intermediate N is compensated by a corresponding high value for O. The change in the electrogenicity of the intermediate N at high pH values seems to be highly pH dependent. This suggests that there is not a well-determined location of a proton donor toward Asp-96, but the conformational changes of the protein and the available free proton in the cytoplasmic side modulate its accessibility. At the end of the photocycle, the protein returns to the unexcited ground state BR.

The used sequential model with reversible reactions proved to be valid for the whole considered pH and temperature range.

We proved that the electrogenicity of the photocycle intermediates, with the exception of the N intermediate, are pH independent. This

indicates that the charge motions inside the protein, during the proton transport steps, are the same for the whole studied pH range. The electric measurements do not give information about the proton release or uptake steps, but show that the transfer of proton from one side of the membrane to the other occur in well determined steps. The constancy of the electrogenicities can be regarded as another indirect proof to the validity of the considered sequential photocycle.

3. Back photoreaction from intermediate M

Study of the switch step in the bacteriorhodopsin photocycle to distinguish between the two M forms could be done by the back photoreaction from intermediate M of the photocycle (**Ludmann és mtsai. 1999**). To achieve reliable information about these phenomena, spectroscopic, absorption kinetic and electric signal measurements were performed on wild type and several mutant bacteriorhodopsins.

To drive the photocycle in intermediate M, different techniques were applied. For wild-type bacteriorhodopsin double-flash experiments were carried out. The mutant D96N was driven in intermediate M with a background light on the sample at pH 9. The mutant D85N produced an M-like intermediate at pH 8 in dark. Each case the accumulated M intermediate was excited by a 420 nm laser flash.

The electric signals of the wild-type protein and mutant D96N, belonging to the back reaction from intermediate M had only negative components. The M-like intermediate of the D85N mutant had only a positive component. A photocycle model for the light driven back reaction of the M intermediate was suggested that contain only two intermediate states. The spectra of these intermediates, the sign and the calculated time constants of the electric signals suggested that the deprotonated Schiff base in the M state after light excitation is quickly reprotonated, but the protein reaches its ground state only in several seconds.

During the back reaction from M in D96N, D85N and M₂ in wild-type BR, the conformation of the protein was oriented toward the cytoplasmic site, but only in the case of D85N was the proton taken up from this side. In all cases the proton is taken up from the side where it was released earlier.

IRODALOM

Saját cikkeim:

Az értekezés anyagát képező közlemények:

Ludmann K., Gergely C., Dér A. és Váró G. 1998b. *Biophys.J.* 75:3120-3126.

Ludmann K., Gergely C. és Váró G. 1998a. *Biophys.J.* 75:3110-3119.

Ludmann K., Ganea C. és Váró G. 1999. *J.Photochem.Photobiol.B:Biological* 49:23-28.

Egyéb közlemények:

Ganea C., Gergely C., **Ludmann K.** és Váró G. 1997. *Biophys.J.* 73:2718-2725.

Batori-Tartsi Z.I., **Ludmann K.** és Váró G. 1999. *J.Photochem.Photobiol.B:Biological* 49:192-197.

Ludmann K., Ibrón G., Lanyi J.K. és Váró G. 2000. *Biophys.J.* 78:959-966.

Rinyu L., Tandori J., Váró G., **Ludmann K.**, Mérai N., Maróti P. és Nagy L. 2000.
(készülőben)

A dolgozatban megemlített cikkek (ábécé sorrendben):

Alexiev U., Marti T., Heyn M.P., Khorana H.G. és Scherrer P. 1994. *Biochemistry* 33:13693-13699.

Ames J.B. és Mathies R.A. 1990. *Biochemistry* 29:7181-7190.

Bagyinka Cs., Whitehead J.P. és Maroney M.J. 1993. *J.Am.Chem.Soc.* 115:3576-3585.

Balashov S.P., Govindjee R. és Ebrey T.G. 1991. *Biophys.J.* 60:475-490.

Balashov S.P., Govindjee R., Imasheva E.S., Misra S., Ebrey T.G., Feng Y., Crouch R.K. és Menick D.R. 1995. *Biochemistry* 34:8820-8834.

Balashov S.P., Imasheva E.S., Govindjee R. és Ebrey T.G. 1996. *Biophys.J.* 70:473-481.

Baldwin R.L. 1986. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:8069-8072.

Bamberg E., Dencher N.A., Fahr A. és Heyn M.P. 1981. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78:7502-7506.

Barabás K., Dér A., Dancsházy Z., Ormos P., Keszthelyi L. és Marden M. 1983. *Biophys.J.* 43:5-11.

Beach J.M. és Fager R.S. 1985. *Photochem.Photobiol.* 41:557-562.

Becher B., Tokunaga F. és Ebrey T.G. 1978. *Biochemistry* 17:2293-2300.

Birge R.R. 1981. *Annu.Rev.Biophys.Bioeng.* 10:315-354.

- Birge R.R. 1990. *Biochim.Biophys.Acta Bio-Energetics* 1016:293-327.
- Birge R.R. és Cooper T.M. 1983. *Biophys.J.* 42:61-69.
- Birge R.R., Cooper T.M., Lawrence A.F., Masthay M.B., Zhang C.-F. és Zidovetzki R. 1991. *J.Am.Chem.Soc.* 113:4327-4328.
- Bitting H.C., Jang D.-J. és El-Sayed M.A. 1990. *Photochem.Photobiol.* 51:593-598.
- Blaurock A.E. és Stoeckenius W. 1971. *Nature* 233:152-155.
- Bogomolni R.A., Hwang S.B., Tseng Y.W., King W.I. és Stoeckenius W. 1977. *Biophys.J.* 17:98a
- Braiman M.S., Bousché O. és Rothschild K.J. 1991. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:2388-2392.
- Braiman M.S., Mogi T., Marti T., Stern L.J., Khorana H.G. és Rothschild K.J. 1988. *Biochemistry* 27:8516-8520.
- Brown L.S., Bonet M.L., Needleman R. és Lanyi J.K. 1993. *Biophys.J.* 65:124-130.
- Brown L.S., Sasaki J., Kandori H., Maeda A., Needleman R. és Lanyi J.K. 1995. *J.Biol.Chem.* 270:27122-27126.
- Butt H.-J., Fendler K., Bamberg E., Tittor J. és Oesterhelt D. 1989. *EMBO J.* 8:1657-1663.
- Cao Y., Brown L.S., Needleman R. és Lanyi J.K. 1993. *Biochemistry* 32:10239-10248.
- Cao Y., Váró G., Klinger A.L., Czajkowsky D.M., Braiman M.S., Needleman R. és Lanyi J.K. 1993. *Biochemistry* 32:1981-1990.

- Chang C.-H., Govindjee R., Ebrey T.G., Bagley K., Dollinger G., Eisenstein L.,
Marque J., Roder H., Vittitow J. és Fang J.M. 1985. *Biophys.J.* 47:509-512.
- Chernavskii D.S., Chizhov I.V., Lozier R.H., Murina T.M., Prokhorov A.M. és Zubov
B.V. 1989. *Photochem.Photobiol.* 49:649-653.
- Chizhov I.V., Chernavskii D.S., Engelhard M., Mueller K.H., Zubov B.V. és Hess B.
1996. *Biophys.J.* 71:2329-2345.
- Chizhov I.V., Engelhard M., Chernavskii D.S., Zubov B. és Hess B. 1992. *Biophys.J.*
61:1001-1006.
- Dér A., Hargittai P. és Simon J. 1985. *J.Biochem.Biophys.Methods.* 10(5-6):295-
300.
- Dér A. és Ormos P. 1995. *Biophys.Chem.* 56:159-163.
- Dér A., Száraz S., Tóth-Boconádi R., Tokaji Z., Keszthelyi L. és Stoeckenius W.
1991. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:4751-4755.
- Dér A., Tóth-Boconádi R. és Keszthelyi L. 1988. *FEBS Lett.* 229:313-316.
- Dér A., Tóth-Boconádi R., Keszthelyi L., Kramer H. és Stoeckenius W. 1995. *FEBS
Lett.* 377:419-420.
- Dér, A., R. Tóth-Boconádi, and S. Száraz. 1992. Electric signals and the photocycle
of bacteriorhodopsin. In Structures and functions of retinal proteins. J.L.
Rigaud, editor. John Libbey and Co., London. 197-200.
- Dancsházy Z., Govindjee R. és Ebrey T.G. 1988. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:6358-
6361.

- Dancsházy Z., Helgerson S.L. és Stoeckenius W. 1983. *Photobiochem.Photobiophys.* 5:347-357.
- Dancsházy Z. és Karvaly B. 1976. *FEBS.Lett.* 72:136-138.
- De Groot H.J.M., Harbison G.S., Herzfeld J. és Griffin R.G. 1989. *Biochemistry* 28:3346-3353.
- De Groot H.J.M., Smith S.O., Courtin J., Van den Berg E., Winkel C., Lugtenburg J., Griffin R.G. és Herzfeld J. 1990. *Biochemistry* 29:6873-6883.
- Dencher N.A. 1983. *Photochem.Photobiol.* 38:753-767.
- Dencher N.A., Kohl K.D. és Heyn M.P. 1983. *Biochemistry* 22:1323-1334.
- Dickopf S., Alexiev U., Krebs M.P., Otto H., Mollaaghababa R., Khorana H.G. és Heyn M.P. 1995. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:11519-11523.
- Dickopf S. és Heyn M.P. 1997. *Biophys.J.* 73:3171-3181.
- Drachev L.A., Kaulen A.D. és Komrakov A.Y. 1992. *FEBS Lett.* 313:248-250.
- Drachev L.A., Kaulen A.D. és Komrakov A.Y. 1993. *Biochem.Int.* 30:461-469.
- Drachev L.A., Kaulen A.D. és Skulachev V.P. 1984. *FEBS Lett.* 178:331-335.
- Drachev L.A., Skulachev V.P., Kaulen A.D. és Zorina V.V. 1987. *FEBS Lett.* 226:139-144.
- Draheim J.E. és Cassim J.Y. 1985. *Biophys.J.* 47:497-507.
- Druckmann S., Friedman N., Lanyi J.K., Needleman R., Ottolenghi M. és Sheves M. 1992. *Photochem.Photobiol.* 56:1041-1047.

- Druckmann S., Ottolenghi M. és Korenstein R. 1985. *Biophys.J.* 47:115-118.
- Ebrey, T.G. 1993. Light energy transduction in bacteriorhodopsin. In
Thermodynamics of membranes, receptors and channels. M. Jackson,
editor. CRC Press, New York. 353-387.
- Eisfeld W., Pusch C., Diller R., Lohrmann R. és Stockburger M. 1993. *Biochemistry*
32:7196-7215.
- Eisfeld, W. and M. Stockburger. 1992. Optical transient studies on the
photochemical cycle of bacteriorhodopsin. In Structures and Functions of
Retinal Proteins. J.L. Rigaud, editor. John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge.
139-142.
- Fukuda K. és Kouyama T. 1992. *Biochemistry* 31:11740-11747.
- Ganea C., Gergely C. és Váró G. 1995. *Electro Magnetobiol.* 14:229-241.
- Garty H., Caplan S.R. és Cahen D. 1982. *Biophys.J.* 37:405-415.
- Gergely C., Ganea C., Groma G.I. és Váró G. 1993. *Biophys.J.* 65:2478-2483.
- Gergely C., Ganea C. és Váró G. 1994. *Biophys.J.* 67:855-861.
- Gergely, C. and G. Váró. 1992. Charge motions in the D85N and D212N mutants of
bacteriorhodopsin. In Structures and functions of retinal proteins. J.L.
Rigaud, editor. John Libbey Eurotext Ltd, London. 193-196.
- Gergely C., Zimányi L. és Váró G. 1997. *J.Phys.Chem.B* 101:9390-9395.
- Gerwert K., Hess B. és Engelhard M. 1990. *FEBS Lett.* 261:449-454.
- Gerwert K., Souvignier G. és Hess B. 1990. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:9774-9778.

- Govindjee R., Balashov S.P. és Ebrey T.G. 1990. *Biophys.J.* 58:597-608.
- Grigorieff N., Ceska T.A., Downing K.H., Baldwin J.M. és Henderson R. 1996. *J.Mol.Biol.* 259:393-421.
- Groma G.I., Hebling J., Ludwig C. és Kuhl J. 1995. *Biophys.J.* 69:2060-2065.
- Groma G.I., Helgerson S.L., Wolber P.K., Beece D., Dancsházy Z., Keszthelyi L. és Stoeckenius W. 1984. *Biophys.J.* 45:985-992.
- Grzesiek S. és Dencher N.A. 1986. *FEBS Lett.* 208:337-342.
- Han B.-G., Vonck J. és Glaeser R.M. 1994. *Biophys.J.* 67:1179-1186.
- Hanamoto J.H., Dupuis P. és El-Sayed M.A. 1984. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:7083-7087.
- Harbison G.S., Smith S.O., Pardo J.A., Courtin J., Lugtenburg J., Herzfeld J., Mathies R.A. és Griffin R.G. 1985. *Biochemistry.* 24:6955-6962.
- Hartmann R. és Oesterhelt D. 1977. *Eur.J.Biochem.* 77:325-335.
- Haupts U., Tittor J., Bamberg E. és Oesterhelt D. 1997. *Biochemistry* 36:2-7.
- Hayward S.B., Grano D.A., Glaeser R.M. és Fisher K.A. 1978. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75:4320-4324.
- Heberle J. és Dencher N.A. 1992. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:5996-6000.
- Heberle J., Oesterhelt D. és Dencher N.A. 1993. *EMBO J.* 12:3721-3727.
- Helgerson S.L. és Stoeckenius W. 1985. *Arch.Biochem.Biophys.* 241:616-627.

- Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E. és Downing K.H. 1990. *J.Mol.Biol.* 213:899-929.
- Hendler R.W., Dancsházy Z., Bose S., Shrager R.I. és Tokaji Z. 1994. *Biochemistry* 33:4604-4610.
- Hessling B., Herbst J., Rammelsberg R. és Gerwert K. 1997. *Biophys.J.* 73:2071-2080.
- Hessling B., Souvignier G. és Gerwert K. 1993. *Biophys.J.* 65:1929-1941.
- Hildebrandt P. és Stockburger M. 1984. *Biochemistry* 23:5539-5548.
- Hofrichter J., Henry E.R. és Lozier R.H. 1989. *Biophys.J.* 56:693-706.
- Holz M., Drachev L.A., Mogi T., Otto H., Kaulen A.D., Heyn M.P., Skulachev V.P. és Khorana H.G. 1989. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:2167-2171.
- Holz M., Lindau M. és Heyn M.P. 1988. *Biophys.J.* 53:623-633.
- Hurley J.B., Becher B. és Ebrey T.G. 1978. *Nature* 272:87-88.
- Hurley J.B. és Ebrey T.G. 1978. *Biophys.J.* 22:49-66.
- Iwasa T., Tokunaga F., Yoshizawa T. és Ebrey T.G. 1980. *Photochem.Photobiol.* 31:83-85.
- Kakitani H., Kakitani T., Rodman H. és Honig B. 1985. *Photochem.Photobiol.* 41:471-479.
- Kalisky O., Goldschmidt C.R. és Ottolenghi M. 1977. *Biophys.J.* 19:185-189.

- Kataoka M., Kamikubo H., Tokunaga F., Brown L.S., Yamazaki Y., Maeda A., Sheves M., Needleman R. és Lanyi J.K. 1994. *J.Mol.Biol.* 243:621-638.
- Kates M., Kushwaha S.C. és Sprott G.D. 1982. *Methods.Enzymol.* 88:98-111.
- Keszthelyi L. és Ormos P. 1980. *FEBS Lett.* 109:189-193.
- Keszthelyi L. és Ormos P. 1983. *Biophys.Chem.* 18:397-405.
- Keszthelyi L. és Ormos P. 1989. *J.Membr.Biol.* 109:193-200.
- Kimura Y., Fujiwara M. és Ikegami A. 1984. *Biophys.J.* 45:615-625.
- Kimura Y., Vassilyev D.G., Miyazawa A., Kidera A., Matsushima M., Mitsuoka K., Murata K., Hirai T. és Fujiyoshi Y. 1997. *Photochem.Photobiol.* 66:764-767.
- Koch M.H.J., Dencher N.A., Oesterhelt D., Plöhn H.-J., Rapp G. és Büldt G. 1991. *EMBO J.* 10:521-526.
- Kononenko A.A., Lukashev E.P., Maximychev A.V., Chamorovsky S.K., Rubin A.B., Timashev S.F. és Chekulaeva L.N. 1986. *Biochim.Biophys.Acta* 850:162-169.
- Kouyama T. és Nasuda-Kouyama A. 1989. *Biochemistry* 28:5963-5970.
- Kouyama T., Nasuda-Kouyama A., Ikegami A., Mathew M.K. és StoECKENIUS W. 1988. *Biochemistry* 27:5855-5863.
- Krebs M.P. és Khorana H.G. 1993. *J.Bacteriol.* 175:1555-1560.
- Lanyi J.K. és Váró G. 1995. *Isr.J.Chem.* 35:365-385.
- Lewis A., Rousso I., Khachatryan E., Brodsky I., Lieberman K. és Sheves M. 1996. *Biophys.J.* 70:2380-2384.

- Litvin F.F. és Balashov S.P. 1977. *Biofizika*. 22:1111-1114.
- Liu S.Y. 1990. *Biophys.J.* 57:943-950.
- Liu S.Y., Govindjee R. és Ebrey T.G. 1990. *Biophys.J.* 57:951-963.
- Liu S.Y., Kono M. és Ebrey T.G. 1991. *Biophys.J.* 60:204-216.
- Lohrmann, R. and Stockburger, M. Evidences for structural changes at the chromophoric site of bacteriorhodopsin during the K-to-L transition. Rigaud, J. L. 221, 147-150. 1992. London, John Libbey and Co. Structures and functions of retinal proteins. (GENERIC)
Ref Type: Conference Proceeding
- Lozier R.H., Bogomolni R.A. és Stoeckenius W. 1975. *Biophys.J.* 15:955-963.
- Lozier R.H., Xie A., Hofrichter J. és Clore G.M. 1992. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:3610-3614.
- Luchian T., Tokaji Z. és Dancsházy Z. 1996. *FEBS Lett.* 386:55-59.
- Luecke H., Richter H.T. és Lanyi J.K. 1998. *Science* 280:1934-1937.
- Luecke H., Schobert B., Richter H.T., Cartailler J.P. és Lanyi J.K. 1999. *Science* 286:255-260.
- Müller K.-H., Butt H.-J., Bamberg E., Fendler K., Hess B., Siebert F. és Engelhard M. 1991. *Eur.Biophys.J.* 19:241-251.
- Marcus M.A. és Lewis A. 1978. *Biochemistry.* 17:4722-4735.
- Mathies R.A., Lin S.W., Ames J.B. és Pollard W.T. 1991. *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* 20:491-518.

- Maurer R., Vogel J. és Schneider S. 1987. *Photochem.Photobiol.* 46:247-253.
- Miercke L.J.W., Betlach M.C., Mitra A.K., Shand R.F., Fong S.K. és Stroud R.M. 1991. *Biochemistry* 30:3088-3098.
- Mitchell P. 1961. *Nature* 191:144-148.
- Mogi T., Stern L.J., Marti T., Chao B.H. és Khorana H.G. 1988. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:4148-4152.
- Mowery P.C., Lozier R.H., Chae Q., Tseng Y.W., Taylor M. és Stoeckenius W. 1979. *Biochemistry* 18:4100-4107.
- Mukhopadhyay A.K., Bose S. és Hendler R.W. 1994. *Biochemistry* 33:10889-10895.
- Mukohata Y., Isoyama M. és Fuke A. 1986. *J.Biochem.(Tokyo)* 99:1-8.
- Nagel G., Kelety B., Möckel B., Büldt G. és Bamberg E. 1998. *Biophys.J.* 74:403-412.
- Nagle J.F. 1991. *Biophys.J.* 59:476-487.
- Nagle J.F. és Morowitz H.J. 1978. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75:298-302.
- Nagle J.F., Parodi L.A. és Lozier R.H. 1982. *Biophys.J.* 38:161-174.
- Nagle J.F., Zimányi L. és Lanyi J.K. 1995. *Biophys.J.* 68:1490-1499.
- Nakanishi K., Balogh-Nair V., Arnaboldi M., Tsujimoto K. és Honig B. 1980. *J.Am.Chem.Soc.* 102:7945-7947.
- Nakasako M., Kataoka M., Amemiya Y. és Tokunaga F. 1991. *FEBS Lett.* 292:73-75.

- Needleman R., Chang M., Ni B., Váró G., Fornes J., White S.H. és Lanyi J.K. 1991. *J.Biol.Chem.* 266:11478-11484.
- Oesterhelt D. 1975. *Ciba.Found.Symp.* 147-167.
- Oesterhelt D. és Stoeckenius W. 1974. *Methods.Enzymol.* 31:667-678.
- Ormos P., Dancsházy Z. és Keszthelyi L. 1980. *Biophys.J.* 31:207-213.
- Ormos P., Hristova S.G. és Keszthelyi L. 1985. *Biochim.Biophys.Acta* 809:181-186.
- Ormos P., Reinisch L. és Keszthelyi L. 1983. *Biochim.Biophys.Acta* 722:471-479.
- Ort D.R. és Parson W.W. 1979a. *Biophys.J.* 25:355-364.
- Ort D.R. és Parson W.W. 1979b. *Biophys.J.* 25:341-353.
- Otto H., Marti T., Holz M., Mogi T., Lindau M., Khorana H.G. és Heyn M.P. 1989. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:9228-9232.
- Otto H., Marti T., Holz M., Mogi T., Stern L.J., Engel F., Khorana H.G. és Heyn M.P. 1990. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:1018-1022.
- Pebay-Peyroula E., Rummel G., Rosenbusch J.P. és Landau E.M. 1997. *Science* 277:1676-1681.
- Pusch, C., R. Diller, W. Einfeld, R. Lohrmann, and M. Stockburger. 1992. The light-induced proton-pump of bacteriorhodopsin studied by resonance Raman and optical transient spectroscopy. In Structures and Functions of Retinal Proteins. J.L. Rigaud, editor. John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge. 143-146.
- Racker E. és Stoeckenius W. 1974. *J.Biol.Chem.* 249:662-663.

- Richter H.T., Brown L.S., Needleman R. és Lanyi J.K. 1996. *Biochemistry* 35:4054-4062.
- Sasaki J., Maeda A., Kato C. és Hamaguchi H. 1993. *Biochemistry* 32:867-871.
- Scherrer P., Alexiev U., Marti T., Khorana H.G. és Heyn M.P. 1994. *Biochemistry* 33:13684-13692.
- Sherman W.V. és Caplan S.R. 1978. *Biochim.Biophys.Acta* 502:222-231.
- Sherman W.V., Eicke R.R., Stafford S.R. és Wasacz F.M. 1979. *Photochem.Photobiol.* 30:727-729.
- Song L., Logunov S.L., Yang D. és El-Sayed M.A. 1994. *Biophys.J.* 67:2008-2012.
- Souvignier G. és Gerwert K. 1992. *Biophys.J.* 63:1393-1405.
- Steinem C., Janshoff A., Höhn F., Sieber M. és Galla H.J. 1997. *Chem.Phys.Lipids* 89:141-152.
- Subramaniam S., Faruqi A.R., Oesterhelt D. és Henderson R. 1997. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:1767-1772.
- Subramaniam S., Gerstein M., Oesterhelt D. és Henderson R. 1993. *EMBO J.* 12:1-8.
- Subramaniam S., Greenhalgh D.A., Rath P., Rothschild K.J. és Khorana H.G. 1991. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:6873-6877.
- Subramaniam S., Marti T. és Khorana H.G. 1990. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:1013-1017.
- Tanford T. 1983. *Annu Rev. Biochem.* 52:379-409.

- Tóth-Boconádi R., Hristova S.G. és Keszthelyi L. 1986. *FEBS Lett.* 195:164-168.
- Thorgeirsson T.E., Milder S.J., Miercke L.J.W., Betlach M.C., Shand R.F., Stroud R.M. és Kliger D.S. 1991. *Biochemistry* 30:9133-9142.
- Tittor J. és Oesterhelt D. 1990. *FEBS Lett.* 263:269-273.
- Tittor J., Soell C., Oesterhelt D., Butt H.-J. és Bamberg E. 1989. *EMBO J.* 8:3477-3482.
- Tokaji Z. és Dancsházy Z. 1992. *FEBS Lett.* 311:267-270.
- Trissl H.W. 1990. *Photochem.Photobiol.* 51:793-818.
- Trissl H.W., Gärtner W. és Leibl W. 1989. *Chem.Phys.Lett.* 158:515-518.
- Turner G.J., Miercke L.J.W., Thorgeirsson T.E., Kliger D.S., Betlach M.C. és Stroud R.M. 1993. *Biochemistry* 32:1332-1337.
- Váró G. 1981. *Acta Biol.Acad.Sci.Hung.* 32:301-310.
- Váró G., Duschl A. és Lanyi J.K. 1990. *Biochemistry* 29:3798-3804.
- Váró G. és Keszthelyi L. 1983. *Biophys.J.* 43:47-51.
- Váró G. és Lanyi J.K. 1989. *Biophys.J.* 56:1143-1151.
- Váró G. és Lanyi J.K. 1990. *Biochemistry* 29:2241-2250.
- Váró G., Duschl A. és Lanyi J.K. 1990. *Biochemistry* 29:3798-3804.
- Váró G. és Lanyi J.K. 1991. *Biochemistry* 30:7165-7171.
- Váró G. és Lanyi J.K. 1991a. *Biochemistry* 30:5008-5015.

- Váró G. és Lanyi J.K. 1991b. *Biochemistry* 30:5016-5022.
- Váró G., Needleman R. és Lanyi J.K. 1995. *Biochemistry* 34:14500-14507.
- Vonck J., Han B.-G., Burkard F., Perkins G.A. és Glaeser R.M. 1994. *Biophys.J.* 67:1173-1178.
- Warshel A. 1978. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75:2558-2562.
- Warshel A. és Ottolenghi M. 1979. *Photochem.Photobiol.* 30:291-293.
- Woese C.R. 1987. *Microbiol.Reviews* 51:221-271.
- Xie A. 1990. *Biophys.J.* 58:1127-1132.
- Zimányi L., Cao Y., Chang M., Ni B., Needleman R. és Lanyi J.K. 1992b. *Photochem.Photobiol.* 56:1049-1055.
- Zimányi L., Cao Y., Needleman R., Ottolenghi M. és Lanyi J.K. 1993. *Biochemistry* 32:7669-7678.
- Zimányi L., Keszthelyi L. és Lanyi J.K. 1989. *Biochemistry* 28:5165-5172.
- Zimányi L., Tokaji Z. és Dollinger G. 1987. *Biophys.J.* 51:145-148
- Zimányi L. és Lanyi J.K. 1989. *Biochemistry* 28:1662-1666.
- Zimányi L. és Lanyi J.K. 1993. *Biophys.J.* 64:240-251.
- Zimányi L., Váró G., Chang M., Ni B., Needleman R. és Lanyi J.K. 1992a. *Biochemistry* 31:8535-8543.