

**EGY PROTON PUMPA MŰKÖDÉSÉNEK ENERGETIKÁJA
ÉS TÖLTÉSMOZGÁSAI**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

LUDMANN KRISZTINA ZELMA



**MTA Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézet**

2000

Tudományos előzmények, célkitűzések

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". Az eubaktériumban ez a klasszikus fotoszintézis, ami klorofill pigmenteken és redox-kémián alapul, az *Archaeobaktériumban* pedig ez egy kromoprotein rendszer, ami retinált (*Vitamin-A aldehyde*) 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. A szubsztráthoz kötött energiák vezérelte kémiai reakciókhoz (ion mozgató 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, protongradiens

formájában, amit a sejt ATP szintézishez használ. A proton pumpálási folyamatnak és ATP szintézisnek ez a fajta összekapcsolódása a Mitchell féle kemiozmótikus elméletet támasztja alá.

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 mozgató erővé. 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. 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.

A bakteriorodopszin fotociklusának leírására az eddigi munkákban több modellt is felhasználtak. A fotociklus köztes állapotai azonban spektrálisan és időben erősen átfednek, 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.

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 mozgató erővé.

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.

Célunk volt az elektromos és abszorpció kinetikai jelek egyidejű illesztése és az egyes köztes állapotokhoz tartozó elektrogenicitások kiszámítása.

Az elektrogenicitások széles pH tartományban való ábrázolása és a köztes állapotok közötti átmenetekhez tartozó töltésmozdulások még pontosabb leírása volt az egyik fontos célkitűzésünk.

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. Célul tűztük ki az M köztes állapot újragjerjesztéses módszerrel történő tanulmányozását és alállapotainak megkülönböztetését.

A fehérje konformáció változásának feltérképezésére és jobb megértésére abszorpció kinetikai és elektromos jel mérések elvégzését tűztük ki célul mutáns bakteriorodopszin mintákon.

Anyagok és módszerek

A vad típusú BR bibormembránokat a *Halobacterium salinarum* S9 törzsből vonták ki az ismert módszer alapján. A mérések elvégzésére poliakrilamid gélbe ágyaztuk a bibormembránokat. Az abszorpció kinetikai jelek mérését öt különböző hőmérsékleten (5 °C és 30 °C között), tíz különböző pH értéken (pH 4,5 és pH 9 között) és öt különböző hullámhosszon végeztük: 410 nm, 500 nm, 570 nm, 610 nm és 650 nm. A minták a mérést megelőzően a pufferekkel (MES, Tris) a kívánt pH értékre beállított mérőoldatban áztak, a mérés előtt a mintákat fényadaptáltuk.

Az abszorpció kinetikai adatok gyűjtését lineáris időskálán, 300 ns és 1 s között végeztük. A mérések minden esetben 100 jel átlagai, ami nagy mértékben javította a jel-zaj viszonyt. A fotociklus köztes állapotai időfüggő koncentráció változásaira a RATE programmal modellillesztést végeztünk (az extinkciós együtthatókat irodalmi adatokból vettük). Az illesztés eredményeképpen megkaptuk a fotociklus köztes állapotai közötti átmenetekhez tartozó mikroszkópikus időállandókat.

Elektromos jel mérések elvégzésére elektromos térrel orientált gél mintákat készítettünk. Az elektromos jelek mérését 20 °C-on, tíz különböző pH értéken végeztük (pH 4.5-9 közötti tartományban). Az elektromos jelek illesztését az abszorpció kinetikai jelekből kiszámolt, a köztes állapotokhoz tartozó, koncentrációk felhasználásával végeztük. Ezzel együtt megkaptuk a köztes állapotokhoz tartozó elektrogenerációsokat, amelyek a membránon belüli töltésmozgások leírását adják.

A D85N és D96N mutánsokat az L-33 törzsből expresszálták és J.K. Lanyi (Irvine, California, USA) laboratóriumából kaptuk. A D96N mutánsból készült gél mintán a 350 nm és 750 nm közötti tartományban, háttérmegvilágítás mellett, szobahőmérsékleten, időfelbontásos spektroszkópiai méréseket végeztünk kapzott optikai sokcsatornás analízátorral (OMA). 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 sajátértékekre való bontás módszerével az OMA-val mért komplex spektrumok jól meghatározott amplitúdókkal rendelkező komponens spektrumokra bonthatók.

Az M állapot újagerjesztését a kettős gerjesztés módszerével, vad típusú bakteriorodopszinon végeztük. A két lézergerjesztés közötti időt változtatva nyomom követtük az M állapot két alállapotának elektromos jeleit. A kapott eredményeket a D96N mutáns pH 8 értéken, illetve a D85N mutáns pH 9 értéken mért elektromos jeleivel hasonlítottuk össze.

Új tudományos eredmények

- 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 retinálban tartalékolt 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 retinálon van. Csak az $M_1 \rightarrow M_2$ átmenetben disszipálódik, és később, az $N \rightarrow BR$ illetve $O \rightarrow BR$ átmenetben a fehérje konformációs fellazulását 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 elektrogenitása, az N állapot elektrogenitását 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 töltésmozdulások 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 újragerjesztése 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).

Az értekezés anyagát képező közlemények

K.Ludmann, C.Gergely, G.Váró: Kinetic and thermodynamic study of the bacteriorhodopsin photocycle over a wide pH range; (1998a) *Biophys.J.* 75: 3110-3119.

K.Ludmann, C.Gergely, A.Dér, G.Váró: Electric signals during the bacteriorhodopsin photocycle, determined over a wide pH range; (1998b) *Biophys.J.* 75: 3120-3126.

K.Ludmann, C.Ganea, G.Váró: Back photoreaction from intermediate M of bacteriorhodopsin photocycle; (1999) *J. Photochem. Photobiol.* 49: 23-28.

Egyéb közlemények

C.Ganea, C.Gergely, K.Ludmann, G.Váró: The role of water in the extracellular half channel of bacteriorhodopsin; (1997) *Biophys. J.* 73: 2718-2725.

Z.Batori-Tartsi, K.Ludmann, G.Váró: The effect of chemical additives on the bacteriorhodopsin photocycle; (1999) *J. Photochem. Photobiol.* 49: 192-197.

K.Ludmann, G.Ibrón, J.K.Lanyi, G.Váró: Charge motions during the photocycle of pharaonis halorhodopsin; (2000) *Biophys. J.* 78: 959-966.

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