

Membránfehérje-töltésátrendeződések detektálása három dimenzióban

PhD értekezés

Oroszi László

Témavezető: Dér András

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet
Szeged, 2003.

TARTALOMJEGYZÉK

ELŐZMÉNYEK.....	4
1. BEVEZETÉS	4
1.1 A bakteriorodopszin protonpumpa.....	4
1.2 Ionpumpák vizsgálata a szuszpenziós módszerrel	9
1.3 Az elektrolit dinamikai modellezése a mezoszkopikus skálán	11
1.4 Az elektrolit Brown-dinamikai modelljéről	13
1.5 Az elektrolit Debye-Hückel elméletéről	14
1.6 A diffúz kettősréteg.....	16
1.7 A munka vázlata.....	17
2. ELEKTROMOS ÉS OPTIKAI MÉRÉSEK BAKTERIORODOPSZINON	18
2.1 A minta	18
2.2 A fotoelektromos mérés	19
2.3 Abszorpciókinetikai mérés és adatkiértékelés.....	22
EREDMÉNYEK.....	25
3. A MÉRÉSI MÓDSZER ELMÉLETI MEGALAPOZÁSA.....	25
3.1 Mintaanizotrópiák, koordinátarendszerek	25
3.2 A tökéletes irányítású minta	27
3.3 A tökéletesen orientált minta.....	30
3.4 A tökéletesen rendezett minta	33
3.5 Realisztikus minták	34
3.6 A térbeli szuperpozíció számítógépes modellezése	38
3.7 Dipólusmomentumok detektálása	44
3.8 Dipólusmomentum-járulékok.....	45
3.9 Megjegyzések.....	46
4. A MÉRÉSI MÓDSZER ALKALMAZÁSA.....	47
4.1 Adatkiértékelés.....	47
4.2 Molekuladinamikai modellek tesztelése	51
4.3 Diskusszió.....	54
5. IONRELAXÁCIÓ - MODELL ÉS IMPLEMENTÁCIÓ	56
5.1 Az ionok mozgásegyenletei	56
5.2 Geometriai vonatkozások, ütközések.....	58
5.3 A diffúz fal	59
5.4 A szimulációs algoritmus	60
5.5 A szimulációs eszköz	61
5.6 Virtuális mérőműszerek	63

6. IONRELAXÁCIÓ - SZIMULÁCIÓK.....	65
6.1 Ellenőrzés a Debye-Hückel elmélet alapján.....	65
6.2 Ionrelaxációs folyamatok sebessége	66
6.3 Kontrollszimulációk	71
6.4 Az intramembrán dipólus-konfiguráció szerepe	73
6.5 A dipólusugrásra adott válasz linearitása	75
6.6 Az ionrelaxáció anizotrópiája.....	76
6.7 Diskusszió.....	76
ÖSSZEFOGLALÁS	79
SUMMARY.....	82
Köszönetnyilvánítás	85
Irodalomjegyzék.....	86

ELŐZMÉNYEK

1. BEVEZETÉS

A biológiai energiaátalakítás és jelátvitel alapvető folyamatai a biomembránokhoz kötötten játszódnak le. A membránok által elválasztott térrészekben lévő elektrolit ionjainak eloszlását, és ennek eredményeképpen a transzmembrán potenciálkülönbséget a membránokban található ioncsatornák és ionpumpák szabályozzák.

A biológiai energiaátalakítás egyes lépéseiben a fény vagy az élelem energiájának felhasználásával membránfehérjék protont transzportálnak a membránon keresztül. Az aktív pumpálási folyamatok eredményeként protontöbblet jelenik meg a membrán egyik oldalán. Az ebben rejlő energiát szintén membránhoz kötött specifikus molekulák hasznosítják. Az energiaátalakítási folyamatban tehát az elektrolit átmeneti energiatárolóként szerepel, ez a Mitchell-féle kemiozmotikus elmélet alap gondolata.

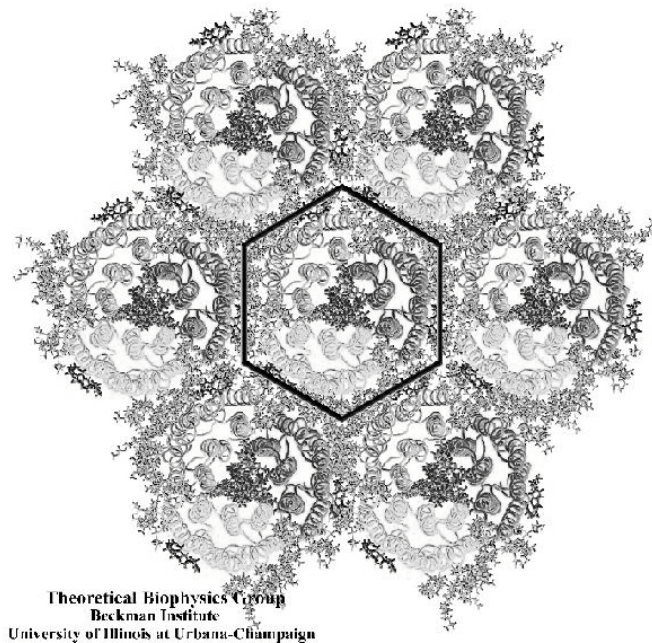
A biológiai jelátvitel során, mind a nyugalmi potenciál stabilizálása, mind az akciós potenciál terjedése ioncsatornák és ionpumpák összehangolt működésével valósul meg. Ebben az esetben is nélkülözhetetlen közvetítő közegként szerepel az elektrolit.

Az ionpumpák működésének tanulmányozása, megértése ezért egyike a biofizika legfontosabb feladatainak. Hasonlóan, az elektrolit dinamikai tulajdonságai is alapvető fontosságúak.

1.1 A bakteriorodopszin protonpumpa

Egy régóta ismert baktérium, a *Halobacterium salinarum* sejtmembránjának egyes részei, az ún. bíbormembrán-fragmentumok speciális fehérje-festék komplexet: bakteriorodopszint (bR) tartalmaznak. A bR molekulák a bíbormembránban egy hexagonális rács rácspontjaiban helyezkednek el úgy, hogy az egyes rácspontokban három - egymással 120°-os szöget bezáró - molekula (bR trimér) foglal helyet (1.1

ábra). Ez a nagyfokú rend tette lehetővé, hogy a bakteriorodopszin térbeli szerkezete röntgen-, elektron- és neutrondiffrakciós vizsgálatok alapján igen nagy pontossággal ismertté váljék (pl. Henderson és mt., 1990).

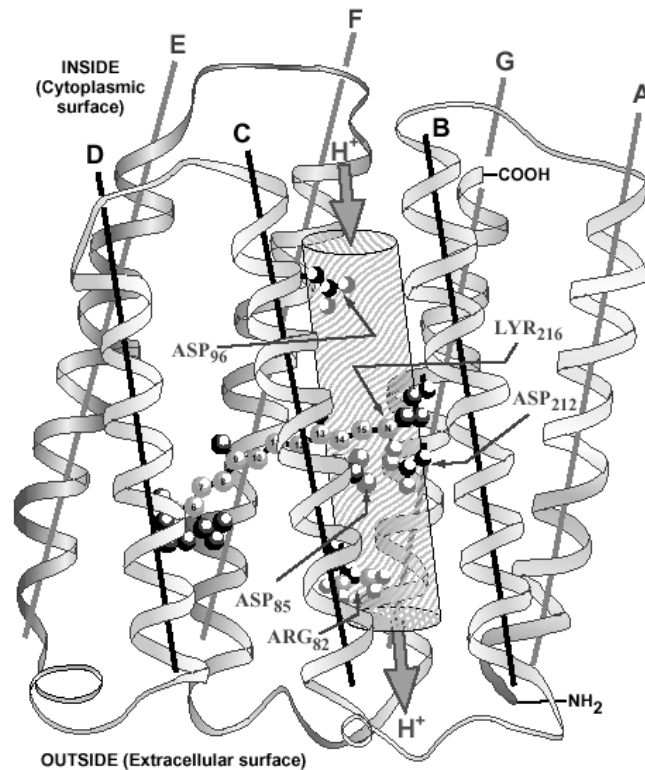


1.1 ábra. Bíbormembrán részlet szerkezeti modellje
(A vonallal körülhatárolt rész a bR trimér) (Schulten és mt., 2003).

A bR molekula fény hatására protont pumpál át a sejten belüli térből a sejten kívüli térbe. A bakteriorodopszin a legegyszerűbb ismert aktív ionpumpa és fényenergia átalakító biológiai rendszer. Ebből adódóan modellként szolgál a biológiai energiaátalakítás alapvető összefüggéseinek tanulmányozásához.

A hét transzmembrán alfa-hélixet (A,B,C,D,E,F,G) tartalmazó makromolekula két fő részből áll: a 248 aminosavból felépülő fehérjéből, és a fehérje egy lizin (Lys-216) aminosavjához kapcsolódó retinál festék molekulából (amelynek átmeneti dipólusmomentum-vektora kb. 20°-os szöget zár be a membrán síkjával (Barabás és mt., 1983)) (1.2 ábra). A bejövő fényt a retinál nyeli el, majd a bR molekula - néhány gyors szerkezeti változás kíséretében - protont juttat át a sejtmembránon keresztül. A protonszállítási folyamatok eredményeképpen a protonkoncentrációban asszimmetria

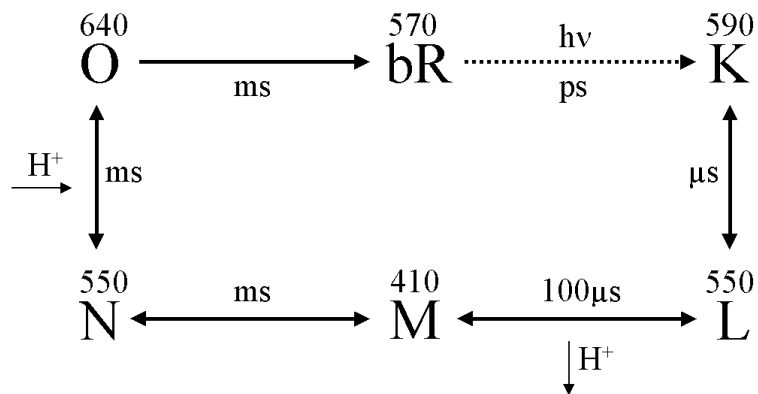
jelenik meg a sejtfal két oldalán, az ebben rejlő energia pedig később ATP molekulák szintézisére fordítódik.



1.2 ábra. A bakteriorodopszin térszerkezetének sematikus ábrázolása (Schulten és mt., 2003).

A bR működésének alapja a fényel történő gerjesztés hatására elinduló ún. fotokémiai ciklus (röviden: fotociklus), amelynek során a molekula több lépésből álló, termikus gerjesztésű reakciókon keresztülhaladva jut vissza alapállapotába. A foton abszorpcióját követő gerjesztett állapotban a retinál a $C_{13}=C_{14}$ kettős kötés körül transz \rightarrow cisz izomerizáción megy keresztül. Ez a folyamat az ún. K állapotban ér véget. A tárolt energia elsődleges formája töltésszétválasztás. Ez az energia több lépésben alakul át: a molekula kvázistabil állapotokon (intermediereken) megy keresztül, miközben a folyamatok eredményeként proton halad át a membránon, a molekula pedig visszatér alapállapotába. Az intermedierek száma, szerkezetei, tulajdonságai, élettartamai, azaz a molekuláris működés részletei még ma sem tekinthetők teljesen tisztázottnak. Az 1.3 ábrán látható a bR fotociklusának egyszerűsített sémája semleges (vagy magas) pH mellett (Lozier és mt., 1975; Haupts és mt., 1999), amely a

spektroszkópiailag szétválasztható intermedierekre szorítkozik. Az intermedierek jelöléseinél az egyes betűk az eltérő abszorpciós spektrumra utalnak, az adott betű fölé írt szám a megfelelő állapothoz tartozó abszorpciós csúcs hullámhosszát adja meg nm egységben, a nyilak mellett szereplő idők pedig az egyes átmenetek időállandóinak nagyságrendjét mutatják. Az L és M intermedierek közötti lépéssel proton adódik le a sejten kívüli térbe, majd később, az N→O átmenettel protont vesz fel a molekula a belső térből. A folyamatok eredményeképpen tehát proton transzportálódik a molekulán keresztül, a sejten kívüli térbe.



1.3 ábra. A bakteriorodopszin fotociklusának egyszerűsített sémája.

A bR rendelkezik néhány előnyös tulajdonsággal, amelyek egyedülállóvá teszik a biológiai eredetű anyagok körében: a fehérjéket tartalmazó bíbormembránfragmentumok könnyen izolálhatók, a bR szerkezeti és működési tulajdonságai izolált állapotukban is megmaradnak, a molekulák nagyfokú stabilitással rendelkeznek.

Különleges jellemzőinek köszönhetően, a bakteriorodopszint már sikeresen alkalmazták dinamikus holografikus filmek alapanyagaként, interferometriás anyagvizsgálatra (Hampp és mt., 1990), képfeldolgozási feladatokra (Miyasaka és mt., 1993; Okada-Shudo és mt., 1996; Joseph és mt., 1996). Környezeti szennyezőanyagok (klóros/aromás szénhidrogének) reverzibilis érzékelésére bioszenzort fejlesztettek ki a fehérjére építve (Frense és mt.). A bakteriorodopszin nemlineáris optikai tulajdonságai alapján egy fontos alkalmazási lehetőség, az optikai számítógép emelhető ki.

Kísérleteket folytatnak a bakteriorodopszin logikai tárolóegységként felhasználó ún. térfogati memóriákkal kapcsolatban (Birge és mt., 1999). Egy biomolekuláris elemeket tartalmazó számítógép térfogata legalább egy nagyságrenddel kisebb lehetne a jelenlegi, félvezetős technológiát alkalmazó rendszerek térfogatánál, míg műveletvégzési sebessége elérhetné a mai érték hozzávetőleg 100-szorosát.

A bakteriorodopszin az ún. rodopszin család egyik tagja. A hét hélixet és retinált tartalmazó transzmembrán fehérjékből álló családba tartozik többek között az emberi szem receptorsejtjeiben található rodopszin is. A bR működésére nyert információk a család tagjai közötti szerkezeti és funkcionális analógiák alapján hasznosíthatók a rokon fehérjék esetében is. A bR protonpumpa működésének megértése tehát mind alaptudományos, mind gyakorlati szempontból nézve nagy jelentőségű.

A bakteriorodopszin 70-es években történt felfedezése óta széleskörű kutatás indult a molekula szerkezetével, működésével kapcsolatban. A bR mára az egyik legjobban ismert aktív ionpumpává vált. Valószínűnek látszik, hogy ez lesz az első aktív transzportfehérje, amelynek működése molekuláris szinten is tisztázottá válik.

A kutatásokat elsősorban spektroszkópai módszerekkel folytatják (látható, UV abszorpciókinetikai, FTIR, CD és rezonancia-Raman spektroszkópai mérések), de a molekula működéséről információ nyerhető fotoelektromos mérések alapján is. E méréseknél a bakteriorodopszin fotociklusa során keltett makroszkopikus elektromos jelet detektálják, amely a molekulákon belüli töltésmozgások következtében jön létre. Fontos kiemelni, hogy a protonpumpa működését kísérő fotoelektromos jel a spektroszkópai mérésektől független információt hordoz.

A bakteriorodopszin működésének leírására több, részben egymást kizáró molekuladinamikai modellt állítottak már fel a közelmúltban. Mivel a modellek alapját képező molekuladinamikai számítások eleve alapul veszik, beépítik a fehérjére vonatkozó spektroszkópai mérések eredményeit, ezért ezen spektroszkópai adatok alapján az egyes modellek érvényessége nem vizsgálható. Ezzel szemben a fotoelektromos mérések kiértékelésével lehetséges a fotociklus intermedierjeinek dipólusmomentumaira kvantitatív módon következtetni, ami lehetőséget ad az egyes molekuladinamikai térszerkezetek ellenőrzésére, és így az adott modellek érvényességének vagy tarthatatlanságának megállapítására.

1.2 Ionpumpák vizsgálata a szuszpenziós módszerrel

A biomembránokhoz csatolt folyamatokból származó elektromos jelek (feszültség vagy áram) mérésére natív rendszerekben széles körben alkalmaznak különféle mikroelektróda-technikákat. E módszer alkalmazása azonban nem mindig lehetséges a gyakorlatban, így például az ionpumpák hatékony vizsgálata céljából többnyire modellrendszerek létrehozására volt szükség.

Egy modellrendszerben a makroszkopikus elektromos jel detektálásának nélkülözhetetlen feltétele a minta elektromos anizotrópiájának megteremtése. A különféle elektromos mérési módszerek ezen anizotrópia elérésének módja szerint csoportosíthatók. Két alapvető kategória különböztethető meg: a modellmembrán- és a szuszpenziós módszer.

A modellmembrán-rendszerek igen széles körben használatosak. A rendszer alapvető komponense a membrán, amely egyrészt tartalmazza a tanulmányozandó ionpumpát, másrészt geometriailag és elektromosan elválasztja egymástól a két elektromosan vezető elektrolit-térfelet. A transzmembrán ionmozgást a két térrészbe merülő elektródák segítségével követik nyomon. Valamennyi modellmembrán-rendszer alapvető tulajdonsága, hogy az ionpumpák egyetlen kétdimenziós rétegben működnek, a mérési elrendezés pedig egydimenziós, azaz csak a membrán normálisának irányába eső töltésmozgás detektálható makroszkopikus szinten. A modellmembrán-rendszerek igen hatékonyak bizonyultak egyes iontraszporter fehérjék működésének vizsgálatában, a módszer sokféle változatát dolgozták ki (Drachev és mt., 1974; Dancsházy és Karvaly, 1976; Herrmann és Rayfield, 1978; Hong és Montal, 1979; Skulachev, 1979; Fahr és mt., 1981; Bamberg és mt., 1981; Trissl, 1990).

Ezt követően az elektromos mérési módszerek egy alapvetően más osztályát is kifejlesztették: az ún. szuszpenziós módszert (Keszthelyi és Ormos, 1980). Ebben az esetben az elektromos mérés az ionpumpákat tartalmazó membránfragmentumok szuszpenzióján történik. A makroszkopikus elektromos jel létrehozásához szükséges anizotrópia a membránfragmentumok elektromos és/vagy mágneses térben történő orientálásával érhető el. Alapvető különbség a modellmembrán-rendszerekhez képest, hogy ebben az esetben sokkal több pumpát tartalmazó kiterjedt szerkezetet vizsgálnak, valamint kialakítható egy háromdimenziós mérési elrendezés, ami lehetővé teszi a tanulmányozott pumpa töltésmozgásainak követését a tér mindhárom irányában. A

szuszpenziós módszer lehetővé teszi a fehérje konformációs átmeneteihez kapcsolt abszorpcióváltozások egyidejű mérését is.

Amint már említettem, a membránfragmentumok orientációja elektromos és/vagy mágneses tér alkalmazásával valósítható meg (Keszthelyi, 1980; Dér és mt., 1995a). Az orientáció mértéke lineáris dikroizmus- vagy fényszórásméréssel állapítható meg (Keszthelyi, 1980; Barabás és mt. 1983). Az orientált membrándarabkák gélben rögzíthetők (Dér és mt., 1985b), ami lehetővé teszi az elektromos mérések széles kísérleti feltételek melletti kivitelezését. Az orientált membránok rögzítésének alternatív módja a szuszpenzió szárítása (Váró, 1981).

A pumpák működése szinkronizálható, ami a makroszkopikusan mérhető elektromos jel kialakulásának további feltétele. A szinkronizáció fényel hajtott rendszerek esetén fényel, más esetekben kémiai ugrással történhet.

A szuszpenziós módszert bakteriorodopszinon, a legegyszerűbb ismert ionpumpán alkalmazták először. Később, a módszer kiterjesztésével tanulmányoztak más ionpumpákat és fényérzékeny fehérjéket is (a Cl⁻ ionokat pumpáló halorodopszint, tintahal rodopszint és az I. fotoszintetikus rendszert) (Dér és mt., 1985a; Dér és mt. 1992a; Govorunova és mt., 1995; Ormos és mt., 1996; Ludmann és mt., 2000). Megjegyzem, hogy az - eredetileg a fotoszintetikus apparátus vizsgálata céljából kifejlesztett - ún. fény-gradiens módszer is tekinthető úgy, mint a szuszpenziós módszer egy változata, ahol is az elektromos anizotrópiát maga a gerjesztő fény hozza létre (Fowler és Kok, 1974; Witt és Zickler, 1973; Trissl és mt., 1982; Sineshchekov és mt., 1992).

A bakteriorodopszin molekula esetében, amikor egyidejűleg rendelkezésre állnak elektromos és abszorpciókinetikai mérési adatok, megállapítható a két független mérési eljárásból származó függvények időbeli korrelációja (Keszthelyi és Ormos, 1980; Váró és Keszthelyi, 1983; Dér és mt., 1985b; Müller és mt., 1991). Az elektromos és abszorpciókinetiai mérések között fennálló korreláció volt az alapja annak, hogy az elektromos jeleket az intramolekuláris töltésmozgások következményeként értelmezzék (Keszthelyi és Ormos, 1980 és 1989). Néhány egyszerűsítő feltételezés (elsőrendű kinetika, egyirányú, elágazásmentes fotociklus, homogén dielektrikum, stb.) felhasználásával, a fotoelektromos mérés alapján következtetéseket vontak le a bR-fotociklus átmeneteihez tartozó protonugrásokra vonatkozólag. Az akkoriban használt egyszerű elmélet ellenére, az eredmények

összhangban voltak az aktuális szerkezeti adatokból nyerhető feltételezésekkel (Henderson és mt., 1990).

Dér és Ormos egy 1995-ben megjelent publikációban először demonstrálta a szuszpenziós módszer háromdimenziós alkalmazhatóságát (Dér, 1995b). Elektromos és mágneses tér kombinált alkalmazásával orientált bakteriorodopszin mintán sikerült meghatározniuk a fehérje által keltett fotoelektromos feszültségeket mind a membránra merőleges, mind az azzal párhuzamos irányokban.

Trissl - egy összefoglaló írásában - elektronikai analógiákra alapozva általánosabb leírását is megadta a szuszpenziós módszerrel mérhető elektromos jelek értelmezésének (Trissl, 1990), valamint próbálkozások történtek a minta dielektromos viselkedésének jellemzésére is (Liu és Ebrey, 1988).

A szuszpenziós módszerrel nyerhető elektromos mérési adatok molekuláris szintű értelmezése korántsem triviális feladat. Számos ponton felmerül az igény alapvető elméleti kérdések tisztázására (Dér és mt., 1992b). Az értekezés egyik fő célja éppen ezen elméleti háttér kiépítése. A szuszpenziós módszerrel mérhető elektromos feszültségjel a minta elektrolitjában szuszpendált membrándarabkáiban lévő makroszkopikus számú molekula konformációváltozásainak hatásaiból tevődik össze igen bonyolult módon. A mérési eredmények megfelelő interpretációjához e speciális térbeli és időbeli szuperpozíció megértésére van szükség. Ez az elméleti probléma az ionrelaxáció problémájára épül, amely az elektrolit dinamikai modellezésével oldható meg.

1.3 Az elektrolit dinamikai modellezése a mezoszkopikus skálán

Az elektrolit biológiai rendszerekben történő modellezése alapján véve három elméleti szinten történik. A legalapvetőbb és legkifinomultabb megközelítés a molekuladinamika (MD), amellyel elsősorban adott fehérjék, illetve azok mikrokörnyezetei modellezhetők. Nagyobb méretű rendszerek felé haladva, magasabb fenomenológiai szinteket képviselő elméletek: a Brown-dinamika (BD) és az elektrolit folytonos elméletei használatosak.

Az elmúlt néhány év során, explicit oldószerral és membránnal számoló molekuladinamikai modellezések eredményeképpen számos membránfehérje, főként ioncsatorna vonatkozásában igen jelentős mennyiségű információval lettünk

gazdagabbak. A számítási teljesítmény lenyűgöző növekedése ellenére, az MD szimulációk továbbra is alapvető problémákkal küszködnek (Roux, 1998). A fő problémát az jelenti, hogy a modellezni kívánt fizikai folyamatok időtartama igen gyakran jóval hosszabb a módszer által kezelhető értéknél.

A Brown-dinamika vonzó alternatívát képvisel a hosszú időtartományokban végzendő szimulációk esetén, tekintve, hogy a módszer az oldószer molekuláit explicit módon nem veszi figyelembe, ami a számítási idő jelentős csökkenésével jár. A BD szimulációk alapja bizonyos effektív erőket tartalmazó sztochasztikus mozgásegyenletek (a Langevin-egyenletek) integrálása. Ez a fizikai megközelítés az ionok oldószerben történő mozgásának alapvetően kaotikus természete miatt megalapozott. A Brown-dinamika alkalmazásával figyelemre méltó mennyiségű információ gyűlt össze ioncsatornákról (pl.: Lauger és Apell, 1982; Jakobson és Chiu, 1987; Chung és mt., 1998; Li és mt., 1998; Schirmer és Phale, 1999; Im és mt., 2000), makromolekuláris polionokról és enzim-szubsztrát kölcsönhatásokról (Wade és mt., 1994; Madura és mt., 1995).

A legmagasabb fenomenológiai szinten találjuk az elektrolit folytonos elméleteit, amelyeket eredetileg "bulk rendszerek" leírására dolgoztak ki a huszadik század elején. A folytonos elméletek érvényességét makroszkopikus rendszerek esetében számtalan kísérlet igazolja, ám a biológiában felmerülő újabb problémák megoldása során rendszerint mezoszkopikus rendszerekre alkalmazzák az apparátust. Nemrég kritikus vizsgálatnak vetették alá a folytonos elméleteket (Poisson-Boltzmann és Poisson-Nernst-Planck) olyan fizikai rendszerek esetében, amelyek karakterisztikus méretei a Debye-hossz nagyságrendjébe esnek (Moy és mt., 2000; Corry és mt., 2000). A folytonos elméletekből és a BD szimulációkból adódó fizikai kép összehasonlítása alapján megállapítást nyert, hogy a Debye-hosszal összemérhető, vagy attól kisebb rendszerekben a folytonos elméletek nem szolgáltatnak megbízható előrejelzéseket.

Munkám során definiáltam és implementáltam egy módosított Brown-dinamikai modellt a mezoszkopikus skálán. Az ionok pályájának számítása a Langevin-egyenlet diffúz tartománybeli határesetén alapul (lásd a következő szakaszt). A modell elhanyagol minden specifikus, rövid hatótávolságú vagy "kémiai" kölcsönhatást (mint például a Pauli- vagy hidratációs erőket, a felületi adszorpció jelenségeket). Az alkalmazott egyszerűsítéseknek köszönhetően lehetővé válik az elektrolit dinamikai modellezése a mezoszkopikus mérettartományban (a modellezett rendszerek lineáris mérete a 100 nm nagyságrendjébe esik). A szimulációs rendszer kifejlesztésének

elsődleges célja az ionrelaxációs folyamatok modellezése, amely közvetlen tudományos jelentősége mellett speciálisan a szuszpenziós módszer egzakt elméleti megalapozásához szükséges.

1.4 Az elektrolit Brown-dinamikai modelljéről

A Brown-dinamikai tárgyalás szerint (Andrew, 2001), az elektrolit dinamikai modellezése a vízben lévő ionok pályáinak - egy sztochasztikus mozgásegyenletre alapozott - egyenkénti számításával történik. Ezt az egyenletet Langevin-egyenletnek hívják, amely a következő formában adható meg az i -edik ionra felírva:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i(t) - \gamma_i m_i \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} + \vec{F}_i^R(t) \quad (1.1)$$

ahol m_i az i -edik ion tömege, \vec{r}_i a helyvektora. A környező vízmolekulák által az ionra gyakorolt hatást egy átlagos közegellenállási erő (jobb oldal, 2. tag) és egy, a véletlenszerű ütközésekből adódó sztochasztikus erő (jobb oldal, 3. tag) vektori összege közelíti. A közegellenállási erőben szereplő γ_i mennyiség reciprokát a sebesség relaxációs idejének nevezik. Ez a mennyiség azt méri, hogy az ion mennyi idő alatt "felejtje el" kezdeti sebességét az oldószer molekuláival történt ütközések hatására. Az egyenletben szereplő $\vec{F}_i(t)$ tag az i -edik ionra ható szisztematikus erő. A szimulációk túlnyomó többségében ez a tag a többi iontól, rögzített és indukált felületi töltésektől származó elektromos erőt jelenti, amelyet tipikusan a Poisson-egyenlet adott határfeltételek melletti megoldásából számítanak ki.

A Langevin-egyenletet numerikus integrálással, diszkrét időlépésekkel oldják meg, a sztochasztikus erőre és a sebesség relaxációs idejére vonatkozó egyszerűsítő feltételezések fölhasználásával. A megoldás három alesete különböztethető meg a sebesség relaxációs ideje és az integrálási lépésköz relatív nagysága alapján. Az első esetben az integrálási lépésköz jóval rövidebb, mint a sebesség relaxációs ideje ($\gamma_i \Delta t \ll 1$). Ekkor az oldószerrel való kölcsönhatás igen gyenge. A nulla kölcsönhatáshoz rendelhető határesetben, a Langevin-egyenlet egy, a Newton-törvényekből származtatható alakba megy át. A másik határesetben, az integrációs

lépés jóval hosszabb, mint a sebesség relaxációs ideje ($\gamma_i \Delta t \gg 1$). Ez az ún. diffúz tartomány, ahol az ionok mozgását az oldószer jelentősen csillapítja. A harmadik eset megfelel az előző két határeset közti átmenetnek. A fenti három tartományban különböző algoritmusokat dolgoztak ki a Langevin-egyenlet megoldására.

A $\gamma_i \Delta t \gg 1$ tartományban, azzal a feltételezéssel, hogy a részecskék közötti erő konstans az integrációs lépés alatt, a következő formulát vezették le (Ermak, 1975; van Gunsteren és mt., 1982):

$$\vec{r}_i' = \vec{r}_i + \frac{\vec{F}_i}{m_i \gamma_i} \Delta t + \vec{R}_i(\Delta t) \quad (1.2)$$

Az ionoknak az oldószer molekuláival való kölcsönhatását (Brown-mozgását) modellező $\vec{R}_i(\Delta t)$ vektor komponensei nulla középértékkel és $2D_i \Delta t = \frac{2kT}{m_i \gamma_i} \Delta t$ varianciával rendelkező Gauss-eloszlásokból vett véletlenszerű minták. A később tárgyalt modellben az (1.2) egyenletre alapozom az ionok mozgásának számítását.

1.5 Az elektrolit Debye-Hückel elméletéről

A Debye-Hückel elmélet (Debye és Hückel, 1923) az ionok között működő nagy hatótávolságú Coulomb-erők alapján magyarázza az elektrolit ideális oldatoktól eltérő viselkedését. Az elmélet alap gondolata a következő: az ellentétes töltésű ionok vonzzák, az azonos töltésű ionok taszítják egymást, ezért bármely kiválasztott ion környezetében az ellentétes töltésű ionok túlsúlyban vannak, az azonos töltésű ionokból pedig kevesebb van időátlagban. Belátható, hogy ennek következtében az ion körül gömbszimmetrikus ionatmoszféra alakul ki, amelynek töltése a központi ion töltésével megegyező nagyságú, de ellentétes előjelű. Az elmélet számos következménye közül most csak az ionatmoszféra árnyékoló hatására térek ki. Ezen effektust használok főleg később az elektrolit dinamikai szimulációját végző számítógépes rendszer kvantitatív ellenőrzésére.

A Debye-Hückel elmélet szerint, egy ze töltésű, rögzített ion körül kialakuló elektrosztatikus potenciál a következő alakban írható fel:

$$\varphi(r) = \frac{ze}{4\pi\epsilon_0\epsilon_w r} \exp\left(-\frac{r}{r_D}\right) \quad (1.3)$$

ahol r_D a Debye féle árnyékolási hossz, amelyet a következő formula ad meg:

$$r_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_w kT}{2e^2 N_A c(\infty)}} \quad (1.4)$$

itt $c(\infty)$ a bulk koncentráció (mM/l egységben), T az abszolút hőmérséklet, N_A az Avogadro-szám és k a Boltzmann-állandó. Az (1.3) egyenlet szerint az ion körül kialakuló (időátlagolt) potenciál az ionoktól mentes vízben érvényes Coulomb-potenciálnak és egy, az ionatmoszféra hatását leíró exponenciális faktornak a szorzata. Az exponenciális tényező miatt a potenciál a távolsággal meredekebben csökken, azaz az ionatmoszféra árnyékoló hatást fejt ki. Az iontól r_D Debye-hossznyi távolságban az elektrosztatikus potenciál éppen e -ed része az ionoktól megfosztott vízben érvényes értéknek. Amint az (1.4) alakból látható, az ionatmoszféra árnyékoló hatása (csökkenő Debye-hossz mellett) nő a koncentráció emelésével, és nő a hőmérséklet csökkentésével.

Megjegyzem, hogy az (1.3) egyenlet akkor érvényes szigorúan, ha a Debye-hossz jóval nagyobb a rögzített töltést hordozó geometriai objektum sugaránál, amely feltétel az általam később vizsgált esetekben (az adott koncentráció és hőmérséklet mellett) teljesül.

Az elektrosztatikus potenciál és az egyes ionfajták koncentrációinak eloszlása között a Boltzmann-reláció teremt kapcsolatot, amely a következő alakban adható meg:

$$c(r) = c(\infty) \exp(-ze\varphi(r)/kT) \quad (1.5)$$

A későbbiekben ezen összefüggés alapján határozom meg a szimulált elektrolitban uralkodó elektrosztatikus potenciált, amelynek exponenciális illesztéséből megkapható a Debye-hossz, és összevethető az (1.4) elméleti értékkel.

1.6 A diffúz kettősréteg

A diffúz kettősréteg első elméleti leírását Gouy adta meg 1910-ben, majd Chapman 1913-ban. Az elméletet ezután sokan finomították, de a jelenség alapvető jellemvonásairól az eredeti, egyszerűbb modell is megfelelően pontos képet ad.

Merítsünk elektrolitba egy elektromos töltéssel rendelkező testet! Az elektrolit ionjainak eredeti, (időátlagban vett) homogén térbeli eloszlása a töltött objektum hatására megváltozik, mégpedig úgy, hogy a test töltésével egyező előjelű töltésű ionok eltávolodnak némiképp, az ellentétes töltésű ionok pedig közelednek a testhez. Az ionok eloszlását alapvetően két tényező határozza meg: az ionok elektromos kölcsönhatása a töltött testtel (és egymás között) valamint az ionok Brown-mozgása az oldószerben. Ezen utóbbi folyamat akadályozza az ionok fölhalmozódását a test felületén, és ehelyett az ionok egy térben kiterjedtebb rétegének megjelenéséhez vezet.

Egy egyszerűbben tárgyalható esetben, szimmetrikus elektrolit és kis felületi töltéssűrűség esetén, a töltött sík elektrosztatikus potenciálja a felülettől mért távolsággal exponenciálisan csökken:

$$\varphi(x) = \varphi_0 \exp\left(-\frac{x}{x_D}\right) \quad (1.6)$$

A képletben szereplő φ_0 a felületi potenciál, x_D pedig a potenciál térbeli lecsengését jellemző Debye-hossz, amely a Debye-Hückel elméletnél bemutatott (1.4) kifejezéssel adható meg egyértékű ionok esetében. Az elektrolit tehát (a Debye-Hückel elméletben tárgyalt esethez hasonlóan) itt is kifejti karakterisztikus árnyékoló hatását, amelyet ugyanaz a Debye-hossz jellemez, ugyanazon ionkoncentráció- és hőmérsékletfüggéssel.

Megjegyzendő, hogy a gyakorlatban az elektrolitban lévő töltött objektumokat vízmolekulák és a felületi töltéssel ellentétes töltésű ionok molekuláris, nem mobilis rétege, az ún. Stern-réteg veszi körül. Az elektrolit mobilis ionjai (az ún. diffúz rétegben) a Stern-réteg által kialakított effektív felületi töltéssűrűséget és felületi potenciált érzékelik. A kettősréteg szerkezetének léteznek finomabb felbontású tárgyalásai is, azonban a mezoszkopikus méretskálán elhanyagolhatók e lokális effektusok, és így például a munka későbbi részében, a Stern-réteg hatását egyszerűen az általa kialakított effektív felületi töltéssűrűséggel veszem figyelembe.

1.7 A munka vázlata

Az értekezésben tárgyalt eredményeket négy részre osztottam (3-6 fejezetek). A 3. fejezet a szuszpenziós módszer elméletének megalapozását tartalmazza. Az elmélet alkalmazását a 4. fejezetben egy konkrét fizikai objektumon, a bakteriorodopszin protonpumpán mutatom be. Az elmélet támaszkodik néhány, az ionrelaxációs folyamat tulajdonságaira vonatkozó feltételezésre, amelyeket az 5. fejezetben vázolt szimulációs rendszer segítségével a 6. fejezetben kifejtett szimulációk alapján támasztok alá.

Megjegyzem, hogy a 4. fejezetben leírt konkrét alkalmazás publikációs időrendben megelőzte valamennyi másik eredményt. Az értekezés sorrendje nem a publikációs sorrendet, nem az eredmények egymásra épülését tükrözi, inkább a kutatás időbeli folyamatához alkalmazkodik.

Munkám elsődleges célja a szuszpenziós módszer elméletének megalapozása az ionrelaxációs folyamatok dinamikai modellezésére építve. Az elektrolit dinamikai szimulációjához létrehozott modell és számítógépes implementáció alkalmazhatósága ugyanakkor túlmutat az ionrelaxáció problémakörén: a rendszer - flexibilitása révén - az elektrolit mezoszkopikus mérettartománybeli dinamikai jelenségeinek feltárásában jelent általánosan használható eszközt.

2. ELEKTROMOS ÉS OPTIKAI MÉRÉSEK BAKTERIORODOPSZINON

A későbbiekben - az értekezésben vázolt elmélet (3. fejezet) egy konkrét alkalmazásaként - a bakteriorodopszin fehérje esetében mutatom be a szuszpenziós módszerrel végzett elektromos mérések interpretációját (4. fejezet). Ez a fejezet a bakteriorodopszin molekulákat tartalmazó minta leírását, a fotoelektromos és abszorpciókinetikai méréseknél használt kísérleti elrendezés vázlatát és a mérési eredmények bemutatását tartalmazza.

2.1 A minta

A fotoelektromos mérések megfelelő érzékenységének eléréséhez a mintában található bR molekulák minél tökéletesebb orientációja szükséges.

A bR molekulákat tartalmazó bíbormembrándarabkák orientálhatók homogén elektromos tér segítségével, mivel a fragmentumok permanens elektromos dipólusmomentummal rendelkeznek. Ez az eljárás azonban két ok miatt nem ad kielégítő eredményt: 1. Az orientáló elektromos tér hatására a permanens dipólusmomentumra merőlegesen indukált dipólusmomentum jön létre, amely az orientációt perturbálja. 2. Eredendően negatív töltésük miatt a bíbormembrándarabkák vándorolnak és aggregátumokat képezhetnek (Keszthelyi, 1980; Barabás és mt., 1983). Külső mágneses tér alkalmazásával a mintában indukált mágneses momentumok kelthetők, és így nagy erősségű, homogén mágneses térben közel tökéletes rendezés érhető el. Ekkor az egyes membrándarabkák normálisai ugyan közel tökéletes szigorúsággal a rendező tér által kijelölt tengellyel párhuzamosak, ám irányításuk véletlenszerű. A fentiekből adódóan a bR minták orientációja elektromos és mágneses terek kombinált alkalmazásával történhet a legpraktikusabban a következő módon (Dér és mt., 1995a): A mintát először rövid időtartamú, gyenge elektromos térnek teszik ki, amely a mintában létrehozza a kezdeti orientációt, ezt követően mágneses térrel fokozzák az orientáció mértékét, miközben az orientált membránfragmentumok szögeloszlását rögzítik egy polimerizálódó gélben.

A mérésekhez használt szuszpenzió a standard eljárás (Oesterhelt és Stöckenius, 1974) szerint preparált bíbormembrán lemezkéket tartalmazott. Az orientáció (és gélbeli rögzítése) előtti szuszpenzió összetételét az alábbi táblázat tartalmazza:

Komponens	Koncentráció
Bíbormembrán	50 μ M
Akrilamid	15 %
N,N' metilénbiszakrilamid	0.8 %
Tetrametiletiléndiamin	1.0 %
Ammóniumperszulfát	0.3 %

2.1 táblázat. A bakteriorodopszin szuszpenzió összetétele.

A szuszpenzió platina elektródákkal határolt 20x15x10 mm méretű küvettában volt. A 20 V/cm nagyságú elektromos térrel történő rendezés után a mintára egy 17.5T erősségű mágneses tér hatott, miközben a gél polimerizációjával a bíbormembránok szögelolszlása rögzítetté vált (Dér András, Nagy Mágneses Tér Laboratórium, Max Planck Intézet, Grenoble, Franciaország). Kizárólag a nagy mágneses tér felhasználásával is készültek minták. A gélben lévő membrándarabkák rendezettségét mágneses kettőtörés mérésekkel ellenőrizték (Maret és Weill, 1983), melyek alapján a rendezettség mértéke közel tökéletesnek adódott. A minta előkészítésére vonatkozó további részletek a (Dér és mt., 1995a) munkában található.

A fotoelektromos és abszorpciókinetikai mérésekhez ugyanazon gélből kivágott mintákat használtak. A fotoelektromos mérések esetében a minta egy $OD_{575}=2$ optikai denzitással rendelkező 1 cm élhosszúságú kocka volt.

2.2 A fotoelektromos mérés

A mintát egy excimer lézer (Lambda Physik LEXtra100, $\lambda=308\text{nm}$, $E\cong 100\text{mJ}$) által hajtott (házi készítésű) Rhodamin 6G festéklézer ($\lambda=690\text{nm}$, $E\cong 10\text{mJ}$) gerjesztette. A

mintához érkező 10 ns időtartamú, $E \approx 100 \mu\text{J}$ energiájú (nem telítő), lineárisan polarizált lézerimpulzus indította el a fotociklus folyamatát a bR minta molekuláiban.

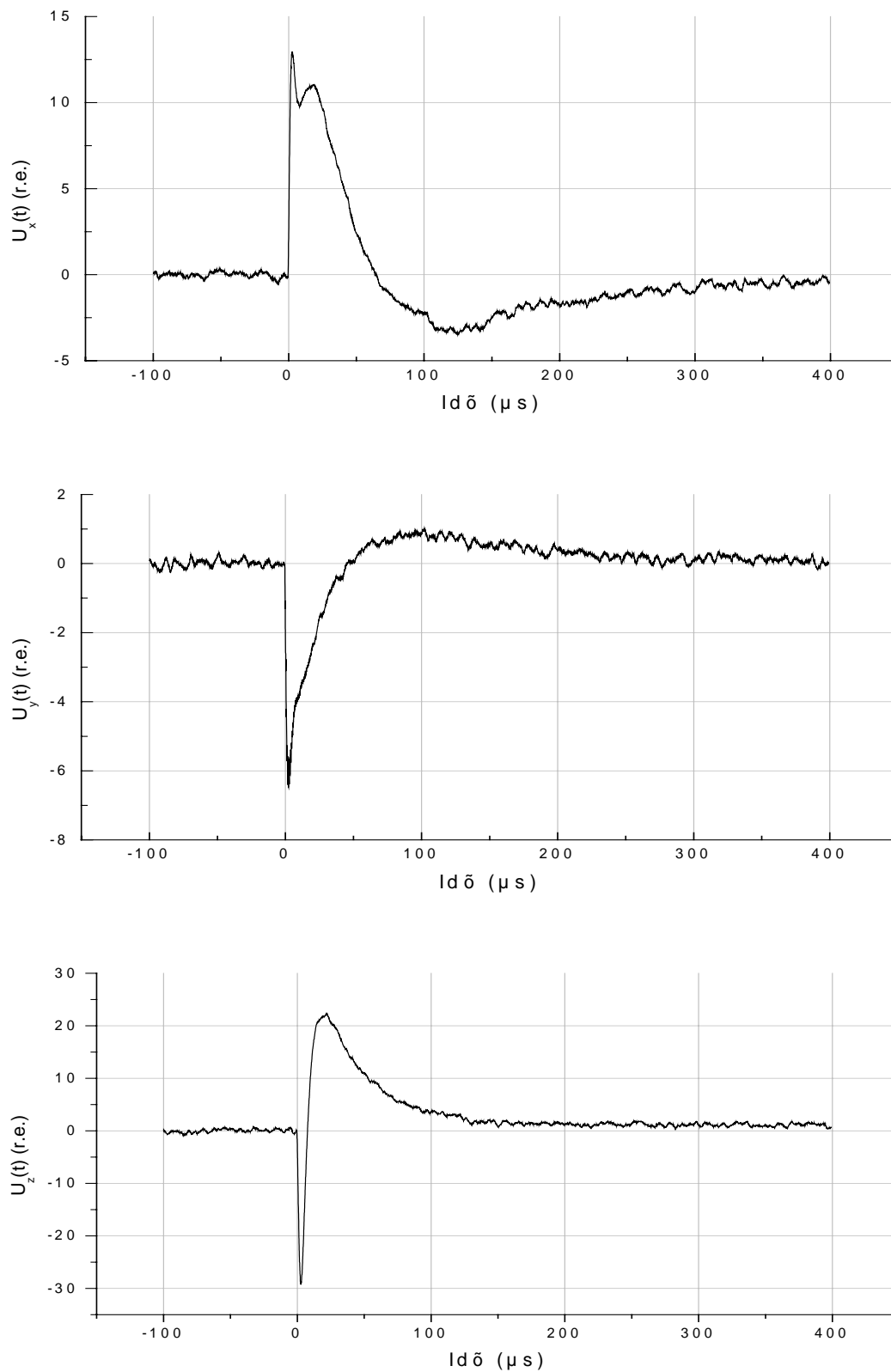
A minta egy vízzel telt mérőcellában helyezkedett el, a gerjesztő fénytől eltakart, egymástól 2 cm távolságban lévő platina elektródák között. A fotociklust gerjesztő lineárisan polarizált lézerimpulzus a mérőcella egy kis ablakán keresztül jutott a mintára.

A fotociklust kísérő fotoelektromos változásokat házi készítésű feszültségerősítő (1000-szeres erősítés) közbeiktatásával egy tranziens rekorder (LeCroy 9310L) rögzítette, 2 μsec időfelbontás mellett. A felvett fotofeszültség görbéket végül számítógépbe juttatták.

Jelöljük z-vel a minta orientációs tengelyének irányát, a mintát gerjesztő fény terjedési irányát x-szel, az ezekre merőleges (a jobbsodrású koordinátarendszer követelménye szerint vett) irányt pedig y-nal. A fény polarizációs síkja a z tengellyel 45°-os szöget zárt be. A mintára szimmetrikus elhelyezésű elektródapárokkal mért, az x, y és z irányokban értelmezett fotofeszültségek a 2.1 ábrán láthatók. Az ábrák az x és y komponensek esetében 400 mérésből számított átlagot, a z komponens esetében 16 mérés átlagát mutatják. A függvényeket a 0 μs -400 μs időtartományban rögzítették, pH=6 és T=23 °C mellett.

Itt csak bizonyítás nélkül előrebocsátom, hogy az x, y és z fotofeszültségek alkalmasan választott molekuláris koordinátarendszer esetén kvantitatív módon hozzárendelhetők a molekuláris x, y és z irányokban lejátszódó dipólusmomentum-változásokhoz. Az x és y komponensek a membrán síkjába eső, a z komponens pedig a membránra merőleges dipólusmomentum-változáshoz tartozik.

Ahogy arról majd a későbbiekben szó lesz, a minta irányítása, az egyes dipólusmomentum-komponensek keveredésének kísérleti kezelése nem triviális feladat. Annak alátámasztására, hogy az egyes fotofeszültségek valóban csak a megfelelő komponenset tartalmazzák, kontrollmérések történtek. Így az x komponens alakjának ellenőrzése a kizárólag mágneses térrel rendezett minta felhasználásával történt. A z komponens ellenőrzése a polarizálatlan gerjesztés mellett mért fotofeszültség alakjának ismeretében volt lehetséges. Az y komponens a minta irányításának pontos beállítása után az x és z irányokra merőleges irányban mérték.



2.1 ábra. A bakteriorodopszin fotociklusának fotofeszültség komponensei.

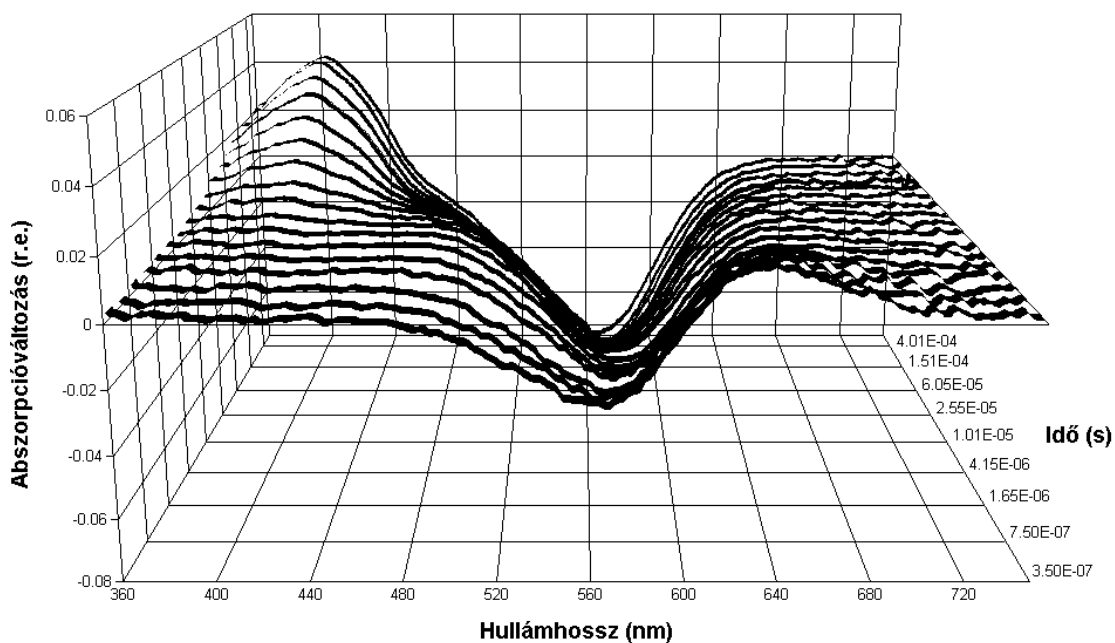
A fotoelektromos mérési adatok kiértékeléséhez ismernünk kell az intermedierek koncentrációinak időfüggését. Ez az információ megszerezhető a bakteriorodopszin fotociklusát követő abszorpcióváltozások mérésével és megfelelő kiértékelésével.

2.3 Abszorpciókinetikai mérés és adatkiértékelés

Az abszorpciókinetikai mérések értelmezése során a differenciaspektrumok időfüggését tartalmazó mátrixot az SVD (singular value decomposition) módszerének felhasználásával analizálták. A módszer megadta a differenciaspektrum-mátrix effektív rangját, ezután a szignifikáns SVD komponensek megtartásával rekonstruálták a mátrixot és kiszűrték a zajt. Az intermedierek abszorpciós spektrumait Monte Carlo keresési algoritmus segítségével származtatták a differenciaspektrumokból (Gergely és mt., 1997). Az egyes intermedierek koncentrációinak időfüggését a differenciaspektrum-sorozatnak az intermedierek-spektrumokkal való – nemnegatív, lineáris, legkisebb négyzetek módszere szerinti – illesztésével adták meg. Ezt követően – lineáris, reverzibilis lépéseket tartalmazó fotociklus sémát feltételezve, házi készítésű számítógépes program felhasználásával (Groma Géza, RATE v2.1) – előállították a kinetikai értelemben vett intermedierek koncentrációinak időfüggését. Az adatkiértékelés egyéb lépéseiben a MATLAB programcsomagot használták.

Az abszorpciókinetikai mérések a fotoelektromos mérésekhez használt gélből kivágott mintán történtek, azonos körülmények (pH=6, T=23 °C) között. A minta gerjesztését követő spektrális változásokat logaritmikus értelemben egyenlő időközönként rögzítették 350 ns-től 400 μ s-ig, a 360-750 nm hullámhossz tartományban, egy kapuzott (diódasor-detektort tartalmazó) optikai sokcsatornás analizátor (Spectroscopy Instruments, Gilching, Germany) felhasználásával.

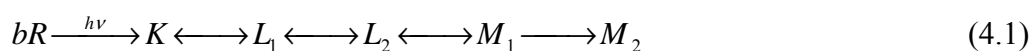
A bakteriorodopszin fotociklusát kísérő abszorpciókinetikai mérés eredményét a 2.2 ábra mutatja. Az ábrán a bakteriorodopszin minta abszorpcióváltozása látható (az alapállapothoz képest) logaritmikus időskálán (a fotociklus folyamata az olvasótól távolodva halad előre).



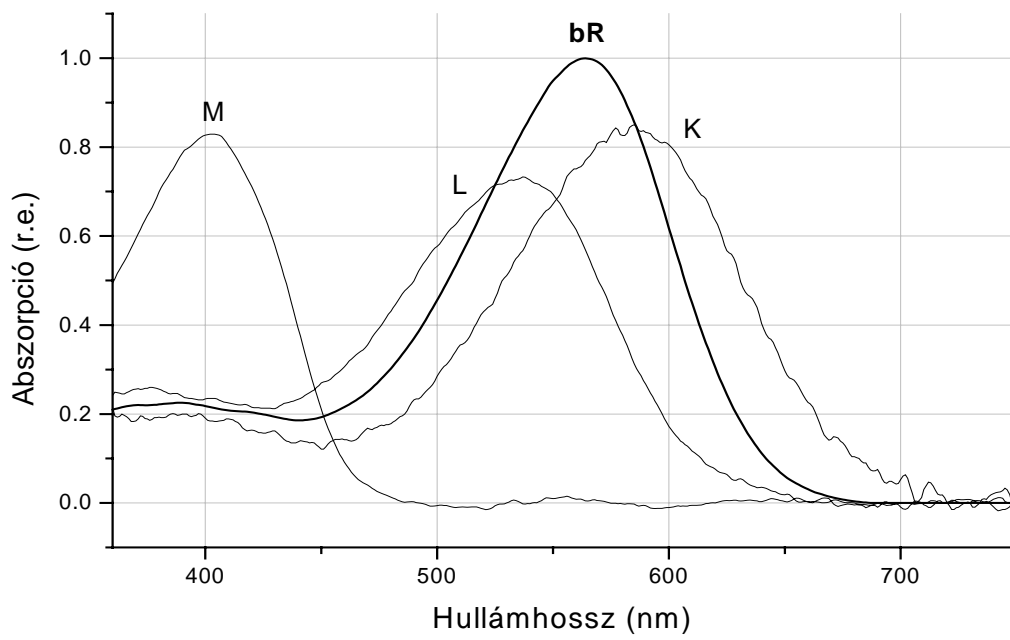
2.2 ábra. A bakteriorodopszin fotociklusának abszorpciókinetikája.

Az abszorpciókinetikai adatok kiértékelése során a differenciaspektrumok időbeli sorozatából felépített mátrix rangja 3-nak adódott az SVD analízis alapján. Ez fizikailag azt jelenti, hogy három, spektrálisan megkülönböztethető intermedier (K, L, M) volt jelen a mérés 350 ns – 400 μ s-os időablakában (az ezeket követő N, O intermediereket nem lehetett kimutatni).

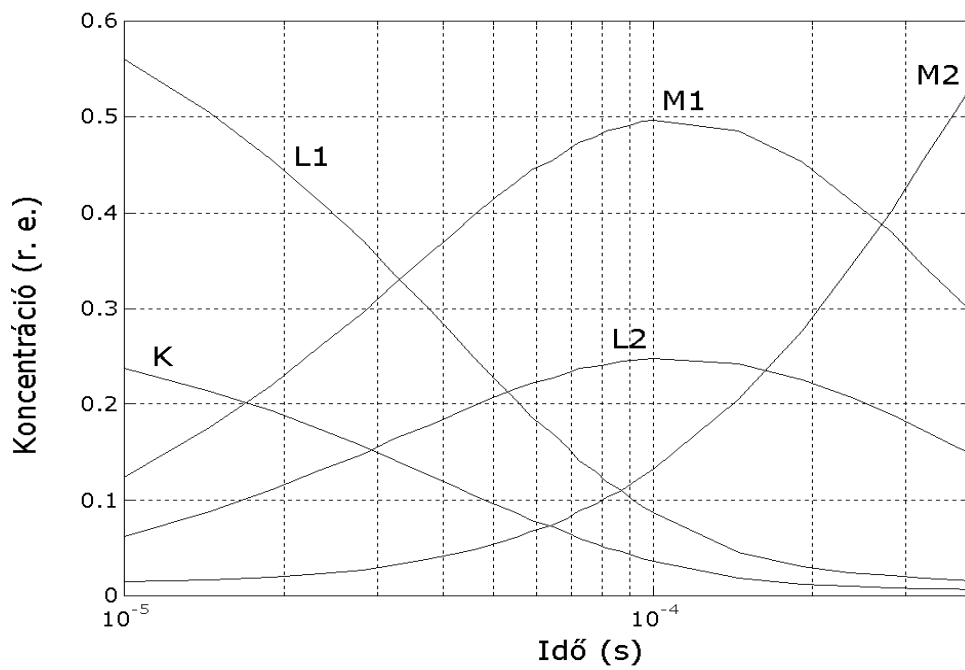
A K, L, M intermedierek abszorpciós spektrumait (2.3 ábra) és koncentrációik időfüggését (2.4 ábra) a (Gergely és mt., 1997) irodalomban részletezett módon, a széles körben alkalmazott és elfogadott



fotociklus gráf alapján állították elő a mérés 400 μ s-ig terjedő időablakában.



2.3 ábra. Az intermedierek számított spektrumai.



2.4 ábra. Az intermedier-koncentrációk számított időfüggése.

EREDMÉNYEK

3. A MÉRÉSI MÓDSZER ELMÉLETI MEGALAPOZÁSA

A szuszpenziós módszer ezen elméleti megalapozása a molekuláris szintről kiindulva kvantitatív összeköttetést létesít a makroszkopikusan detektálható (foto) feszültségek és az azokat létrehozó intramembrán dipólusmomentum-változások között. A leírás a bR-bíbormembrán rendszerből indult ki eredetileg, de nem specifikus rá olyan értelemben, hogy sehol sem használja ki a bR molekula vagy a bíbormembrán speciális tulajdonságait. Ezért a továbbiakban általánosságban fehérjéről és membránról lesz szó.

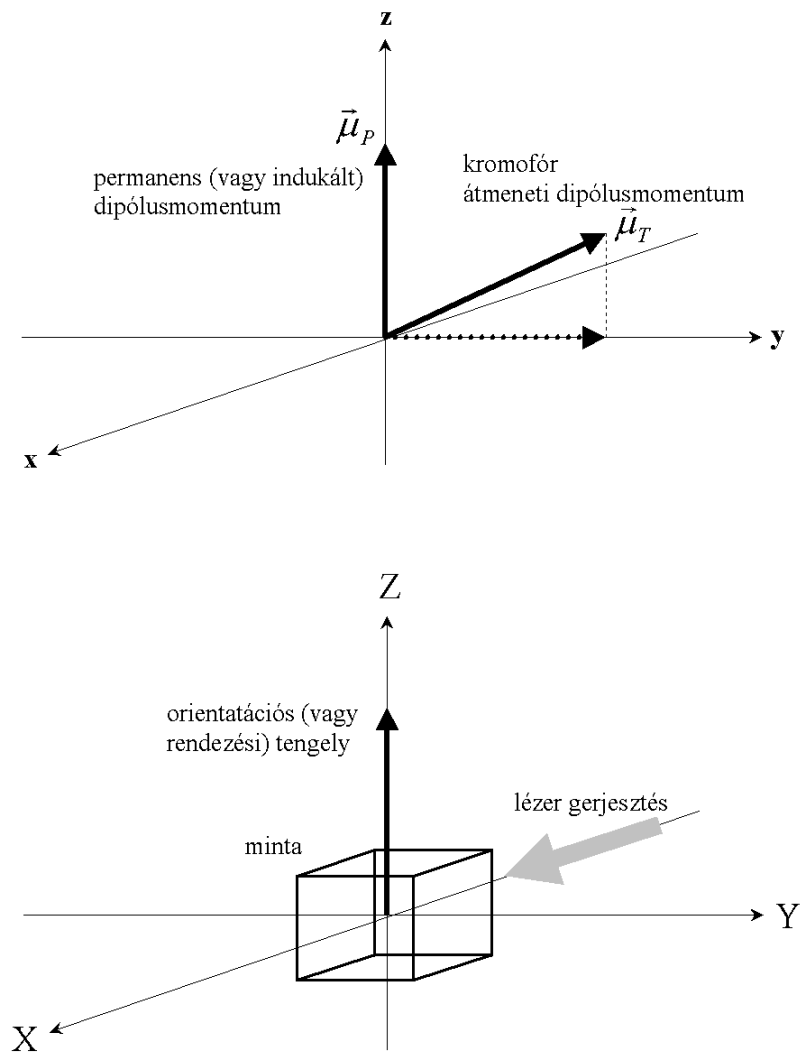
3.1 Mintaanizotrópiák, koordinátarendszerek

A gondolatmenetek során kétféle koordinátarendszert fogok használni: a fehérjéhez rögzített molekuláris koordinátarendszert és a laboratóriumhoz rögzített laboratóriumi koordinátarendszert (mindkettő derékszögű, jobbsodrású) (3.1 ábra).

A molekuláris koordinátarendszer origóját válasszuk meg a fehérje belsejében tetszőlegesen (pl. a molekula geometriai középpontjában, az elmélet következtetései ugyanis függetlenek az origó megválasztásától), a laboratóriumi koordinátarendszer origóját pedig definiáljuk a minta geometriai középpontjával.

A molekuláris koordinátarendszer z tengelyét a fehérjének (vagy a fehérjét tartalmazó membránnak) az orientációban/rendezésben résztvevő permanens/indukált dipólusmomentuma definiálja. Ha a fehérje rendelkezik lineáris kromofórral (amelyhez egyértelműen hozzárendelhető egy átmeneti dipólusmomentum), akkor az y tengelyt a kromofór átmeneti dipólusmomentumának a z tengelyre merőleges síkban vett vetülete jelöli ki (az x tengely a jobbsodrású rendszer követelményéből adódik). Ha a molekula nem tartalmaz lineáris kromofórt, akkor az elméleti leírás szempontjából közömbös, hogyan választjuk meg az x és y tengelyeket.

A laboratóriumi koordinátarendszer z tengelyét a minta orientációs/rendezési iránya adja meg. Ha a fehérjében lévő lineáris kromofórt gerjesztjük, akkor az x irányt a gerjesztő lézerimpulzus terjedési iránya határozza meg (y a jobbsodrású rendszer követelményéből adódik), egyébként az x és y irányok megválasztása tetszőleges.



3.1 ábra. A molekuláris (felül) és laboratóriumi (alul) koordinátarendszer definíciója.

Az elméleti leírás a minta anizotrópiás minősége, azaz a molekulák szögeloszlása alapján tagozódik. A minták közös jellemzője, hogy makroszkopikus számú, rotációs értelemben rögzített membrándarabkát tartalmaznak, amelyekbe a vizsgált fehérje

irányított módon épül be. A membrándarabkákról feltesszük, hogy azok geometriailag jól közelíthetők különböző sugarú korongokkal. Definiáljuk a következő mintákat!

Tökéletes irányítású minta: Ebben a legegyszerűbb, idealizált esetben a membránokban lévő fehérjék mindegyike pontosan azonos irányítású (a membránkorongok párhuzamosak egymással, a molekuláris koordinátarendszerek tengelyei azonos irányba mutatnak). Ezen elméleti eset alapján érthetők meg a valóságban előállítható alábbi, bonyolultabb minták:

Orientált minta: Ha a mintában lévő membrándarabkák rendelkeznek eredő *permanens* elektromos dipólusmomentummal, akkor lehetséges elektromos térrel orientálni azokat. A homogén térrel történő orientálás hatására előálló szögeloszlás rögzíthető adott fixálási eljárással (Dér és mt., 1985b), majd a mérések az így "befagyasztott" mintán elvégezhetők.

A tökéletes orientáció elméleti esetéhez (amikor is a membránkorongok párhuzamos helyzetűek, a molekuláris koordinátarendszerek z tengelyei azonos irányba mutatnak) tartozó mintát "tökéletesen orientált mintának" fogom hívni.

Rendezett minta: Amennyiben a mintában lévő membrándarabkákban *indukált* elektromos/mágneses dipólusmomentum hozható létre, úgy lehetséges azokat elektromos/mágneses térrel rendezni. A homogén térrel történő rendezés hatására előálló szögeloszlás rögzíthető adott fixálási eljárással (Dér és mt., 1995a), majd a mérések az így "befagyasztott" mintán elvégezhetők.

A tökéletes rendezés elméleti esetéhez (amikor is a membránkorongok párhuzamos helyzetűek, a molekuláris koordinátarendszerek z tengelyei párhuzamosak egymással, de irányításuk véletlenszerű) tartozó mintát "tökéletesen rendezett mintának" fogom hívni.

A továbbiakban, a matematikai jelölésekkel kapcsolatban ragaszkodni fogok ahhoz, hogy felső index mindig vektorkomponenst (vagy mátrixkomponenst) jelöl, az alsó index pedig valamiféle minőségi megkülönböztetés célját szolgálja.

3.2 A tökéletes irányítású minta

Amint említettem, ez a minta makroszkopikus számú, tökéletesen irányított fehérjemolekulát tartalmaz, amelyek egymással párhuzamos helyzetű

membránkorongokban helyezkednek el. Működésük során a molekulák bizonyos konformációváltozásokon, köztes állapotokon (intermediereken) mennek keresztül. Elképzelhetjük például, hogy a konformációs változások háttérében egy ionpumpálási mechanizmus áll, a folyamatot pedig egy fényimpulzus indítja el szinkron módon a teljes mintában. Szemeljük ki egy molekulát a sokaságból! Az i -edik intermedierhez tartozó dipólusmomentumot (a molekuláris koordináta-rendszerben) jelölje μ_i^k . Összpontosítsuk figyelmünket az $i \rightarrow j$ átmenetre, amelynek során a molekula dipólusmomentuma $\mu_{ij}^k = \mu_j^k - \mu_i^k$ értékkel változik meg adott t_T átmeneti idő alatt. Elméletünkben feltételezzük, hogy az elektrolit ezt a μ_{ij}^k átmeneti dipólust a konformációs átmenet t_T időtartamához képest hosszú, viszont az intermedierek t_L élettartamához mérten rövid t_R relaxációs idővel árnyékolja le. Azaz írhatjuk, hogy:

$$t_T \ll t_R \ll t_L \quad (3.1)$$

Az ionrelaxáció sebességére vonatkozó fenti reláció teljesülésének vizsgálatára a későbbiekben, az elektrolit dinamikai modellezése során visszatérek.

Tekintsük tehát az $i \rightarrow j$ átmenetet! Képzeljük el, hogy egy, az ionrelaxáció karakterisztikus idejéhez képest időpillanatnak tekinthető időintervallumban adott, makroszkopikus számú $i \rightarrow j$ átmenet zajlik le a mintában lévő korongok véletlenszerű helyein. A rendszer (molekulák + elektrolit) ezen átmenetektől származó teljes dipólusmomentuma a $\mu_{ij}^k = \mu_j^k - \mu_i^k$ dipólusmomentum-változással arányos értékről idővel fokozatosan lecsökken, mivel az elektrolit adott relaxációs idővel leárnyékolja azt. Ezt a dipólusmomentum időfüggvényt jelöljük $\tilde{\mu}_{ij}^k(t)$ -vel. (Noha az egyes fehérjékhez tartozó dipólusmomentum-járulékok igen jelentős időbeli fluktuációkkal rendelkeznek az egyedi ionmozgások következtében, a $\tilde{\mu}_{ij}^k(t)$ függvény már jóldefiniált.)

Jelöljük az i -edik intermedier koncentrációját $x_i(t)$ -vel. Az intermedierek között elsőrendű kémiai reakciókat feltételezve, az $i \rightarrow j$ átmenetben résztvevő molekulák száma arányos az $x_i(t)$ koncentrációval és a k_{ij} sebességi állandóval. Ekkor a rendszer $i \rightarrow j$ átmenettől származó teljes dipólusmomentuma:

$$\tilde{\mu}_{ij}^k(t)_\Sigma \sim \int_0^t \tilde{\mu}_{ij}^k(t-t_0) k_{ij} x_i(t_0) dt_0 \quad (3.2a)$$

A $\tilde{\mu}_{ij}^k(t)$ függvény az intermedierek élettartamához mérten rövid idő alatti lecsengésének, és az integrál μ_{ij}^k -vel való arányosságának feltételezésével (ezt az ionrelaxáció modellezésével alapozom meg később):

$$\begin{aligned} \int_0^t \tilde{\mu}_{ij}^k(t-t_0) k_{ij} x_i(t_0) dt_0 &\equiv \int_{t-t_R}^t \tilde{\mu}_{ij}^k(t-t_0) k_{ij} x_i(t_0) dt_0 \equiv \\ &\equiv k_{ij} x_i(t) \int_{t-t_R}^t \tilde{\mu}_{ij}^k(t-t_0) dt_0 \sim k_{ij} x_i(t) \cdot \mu_{ij}^k \end{aligned} \quad (3.2b)$$

Így a következő relációt nyertük:

$$\tilde{\mu}_{ij}^k(t)_\Sigma \sim \mu_{ij}^k k_{ij} x_i(t) \quad (3.2c)$$

Most tekintsük az összes $i \rightarrow j$ átmenettől származó $\tilde{\mu}^k(t)_\Sigma$ dipólusmomentumot:

$$\begin{aligned} \tilde{\mu}^k(t)_\Sigma &= \sum_{i,j} \tilde{\mu}_{ij}^k(t)_\Sigma \sim \sum_{i,j} \mu_{ij}^k k_{ij} x_i(t) = \sum_{i,j} (\mu_j^k - \mu_i^k) k_{ij} x_i(t) = \\ &= \sum_j \mu_j^k \sum_i k_{ij} x_i(t) - \sum_i \mu_i^k \sum_j k_{ij} x_i(t) = \\ &= \sum_i \mu_i^k \sum_j k_{ji} x_j(t) - \sum_i \mu_i^k \sum_j k_{ij} x_i(t) = \\ &= \sum_i \mu_i^k \sum_j [k_{ji} x_j(t) - k_{ij} x_i(t)] = \sum_i \mu_i^k \frac{d}{dt} x_i(t) \end{aligned} \quad (3.3)$$

Az utolsó lépésben felhasználtuk a $\frac{d}{dt} x_i(t) = \sum_j [k_{ji} x_j(t) - k_{ij} x_i(t)]$ összefüggést, amely az i -edik intermediér reakcióihoz tartozó, az $x_i(t)$ koncentrációra felírt differenciálegyenlet.

A $\mu^k(t) \stackrel{def}{=} \tilde{\mu}^k(t)_\Sigma$ egyszerűsítő jelöléssel, eredményül tehát a következőt kapjuk:

$$\mu^k(t) \sim \sum_i \mu_i^k \frac{d}{dt} x_i(t) \quad (3.4)$$

Ezek szerint a rendszer (összes molekula + elektrolit) teljes dipólusmomentuma arányos az intermedier-koncentrációk időbeli deriváltjainak lineáris kombinációjával, az arányossági tényezők az egyes intermedierek dipólusmomentumai. Mivel a $\mu^k(t)$ makroszkopikus dipólusmomentum csak a μ_i^k intermedier dipólusmomentumok különbségeitől függhet, ezért a μ_i^k értékek (3.4)-ből csak egy közös c^k konstans tag erejéig határozhatók meg, amelyet $-\mu_0^k$ -nak választok meg a továbbiakban (ekkor az alapállapot dipólusmomentuma nulla). Hangsúlyozom, hogy a (3.4) összefüggés alapján kapható μ_i^k értékek csak egy ismeretlen α^k szorzófaktor erejéig határozottak, amelynek komponensei a tér három irányában eltérhetnek egymástól az ionrelaxáció esetleges anizotrópiája miatt (erre a későbbiekben még visszatérek).

Ha a tökéletes irányítású minta megvalósítható lenne, akkor a megfelelően elhelyezett elektródapárok segítségével mérhető $u^k(t)$ makroszkopikus feszültségekből a $\mu^k(t)$ függvények közvetlenül adódnának. A “távoli zónában” mért potenciál esetén a multipólus-potenciálok elhanyagolhatók, fennál az $u^k(t) \sim \mu^k(t)$ arányosság, és így a μ_i^k molekuláris dipólusmomentumok (3.4) alapján számolhatók lennének.

Ebben a fejezetben tehát megmutattam, hogyan határozhatók meg a $\mu^k(t)$ függvényekből a μ_i^k molekuláris dipólusmomentumok. A következőkben arra keresem a választ, hogyan kaphatók meg a $\mu^k(t)$ függvények a mérhető $u^k(t)$ makroszkopikus feszültségekből realisztikusabb minták esetén, ahol a molekulák szögeloszlása bonyolultabb.

3.3 A tökéletesen orientált minta

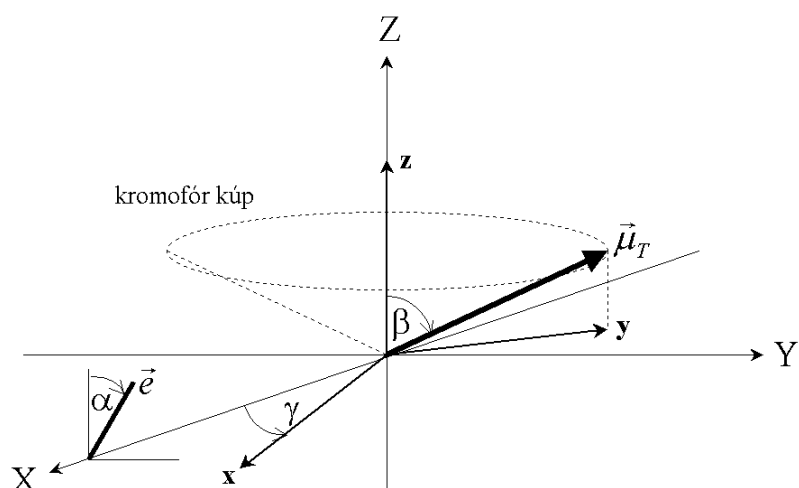
Definíció szerint a tökéletesen orientált mintában a fehérjék molekuláris z tengelyei és a laboratóriumi z tengely pontosan azonos irányba mutat, a molekuláris x és y tengelyek iránya véletlenszerű.

A molekuláris koordinátarendszerek ezen irányeloszlásából közvetlenül adódik, hogy a konformációs változásokhoz kapcsolódó molekuláris μ_{ij}^z dipólusmomentum-változások a laboratóriumi z irányban konstruktív módon adódnak össze, és létrehozzák a makroszkopikusan detektálható $\mu^z(t)$ dipólusmomentumot. Ezzel szemben, a molekuláris z tengelyre merőleges síkban lévő μ_{ij}^x és μ_{ij}^y komponensek makroszkopikus szinten kioltják egymás hatását.

A fotoszelekció esete:

Amennyiben a vizsgált molekuláris folyamatot egy lineáris kromofóron történő fényabszorpciós folyamat indítja el, lehetséges a minta anizotrópiájának (tranziens) növelése lineárisan polarizált gerjesztőfény alkalmazásával. A gerjesztési valószínűség a kromofór átmeneti dipólusmomentumának és a gerjesztő fény elektromos térvektorának skalárszorzat-négyzetével arányos. Ezt a polarizált fényel megvalósított irányfüggő folyamataktiválást fotoszelekciónak nevezik.

Tökéletes orientáció esetén, a mintában lévő kromofórok egy kúp felületére illeszthetők, amelynek fél nyílásszögét jelölje β (3.2 ábra). A gerjesztő fénysugár elektromos térerősségvektora és a laboratóriumi z tengely által bezárt szöget jelöljük α -val.



3.2 ábra. A kromofór kúp a tökéletesen orientált minta esetében.

Egy, a laboratóriumi koordinátarendszer y tengelyével γ szöget bezáró molekuláris y tengellyel rendelkező fehérje gerjesztési valószínűségére a következő arányosság írható föl:

$$p(\alpha, \gamma) \sim [\bar{e}(\alpha)\bar{\mu}_T(\gamma)]^2 \quad (3.5)$$

ahol $\bar{\mu}_T(\gamma)$ a kromofór átmeneti dipólusmomentumát, $\bar{e}(\alpha)$ a gerjesztő fény elektromos térerősségvektorát jelöli.

A $\mu^k(t)$ függvény l -edik laboratóriumi tengelyre eső vetületére felírhatjuk:

$$\mu_L^{lk}(\alpha, \gamma, t) \sim p(\alpha, \gamma)r^{lk}(\gamma)\mu^k(t) \quad (3.6)$$

ahol $r^{lk}(\gamma)$ a laboratóriumi koordinátarendszert a molekuláris rendszerbe transzformáló forgatás mátrixa. Most vegyük tekintetbe az össze molekula hatását:

$$\begin{aligned} \mu_L^{lk}(\alpha, t) &\sim \int_0^{2\pi} \mu_L^{lk}(\alpha, \gamma, t) d\gamma \sim \int_0^{2\pi} p(\alpha, \gamma)r^{lk}(\gamma)\mu^k(t) d\gamma = \\ \mu^k(t) \int_0^{2\pi} p(\alpha, \gamma)r^{lk}(\gamma) d\gamma &= \mu^k(t) \cdot f^{lk}(\alpha) \end{aligned} \quad (3.7)$$

Az $f^{lk}(\alpha) = \int_0^{2\pi} p(\alpha, \gamma)r^{lk}(\gamma) d\gamma$ komponensek kiszámítása az alábbi eredményt adja:

$$[f^{lk}(\alpha)] = \begin{bmatrix} \sim \sin 2\beta \sin 2\alpha & 0 & 0 \\ 0 & \sim \sin 2\beta \sin 2\alpha & 0 \\ 0 & 0 & f^{zz}(\alpha) \end{bmatrix} \quad (3.8)$$

Eszerint fotoszelekció segítségével a tökéletesen orientált mintában megkapható a $\mu^k(t)$ függvény mindhárom komponense. A mátrix diagonális alakjából következik, hogy az egyes komponensek az egyes laboratóriumi tengelyeken elkülönülten jelennek meg. A $\sin 2\alpha$ függvénynek az $\alpha = 45^\circ (+k * 90^\circ)$ értékeknél van szélsőértéke, így a

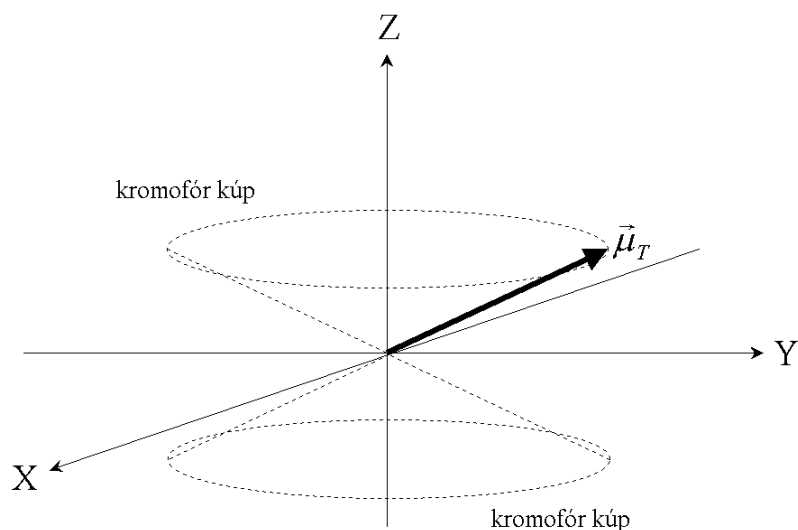
$\mu^x(t)$ és $\mu^y(t)$ komponensek laboratóriumi vetületei $\alpha = 45^\circ$ polarizációs szög esetén érik el maximumukat (a kromofór β szögétől függetlenül), tehát a fotoszelekciós hatás ekkor a legkifejezettebb. Az is látható, hogy a fotoszelekció a $\beta = 45^\circ$ kromofór szög mellett maximális, míg a $\beta = 0^\circ, 90^\circ$ határesetekben az effektus megszűnik.

3.4 A tökéletesen rendezett minta

Definíció szerint a tökéletesen rendezett mintában a molekuláris z tengelyek és a laboratóriumi z tengely párhuzamosak egymással, ám a molekuláris z tengelyek irányítása véletlenszerű (az egyes molekuláris x és y tengelyek iránya is véletlenszerű). Makroszkopikus számú molekulát tartalmazó minta esetében ez azt jelenti, hogy a molekulák fele egy adott irányba, másik fele az azzal ellentétes irányba "áll". Mindebből következik, hogy az egyes elemi folyamatokból származó dipólusmomentum-változások hatásai kiejtik egymást, így a makroszkopikus szinten detektálható eredő dipólusmomentum bármely térbeli komponense nulla lesz.

A fotoszelekció esete:

Amennyiben a molekulák rendelkeznek lineáris kromofórral, és lineárisan polarizált fényt alkalmazhatunk a konformációs változások beindítására, érdekesebb esettel állunk szemben. A tökéletesen rendezett mintában lévő fehérjék kromofórijai egy kettős kúpra illeszthetők (3.3 ábra). Válasszunk ki egy kromofórt a felső kúpon. Ehhez található egy olyan kromofór az alsó kúpon, amelynek átmeneti dipólusmomentuma párhuzamos a felső kúpon kiválasztott kromofór átmeneti dipólusmomentumával, és így ugyanakkora gerjesztési valószínűség tartozik hozzá. E két kromofórhoz tartozó molekuláris koordinátarendszerek a molekuláris x tengely körüli 180° -os forgatással vihetők át egymásba. Ez azt jelenti, hogy az y és z molekuláris tengelyek a két kromofórhoz tartozó molekula esetében éppen ellentétes irányba mutatnak. Így kizárólag csak az x molekuláris irányba eső dipólusmomentum-változások adódhatnak össze konstruktív módon és jelentkezhetnek makroszkopikus szinten.



3.3 ábra. A kettős kromofór kúp a tökéletesen rendezett minta esetében.

A tökéletesen orientált minta esetében bemutatott számításhoz hasonló módon a következő eredmény adódik:

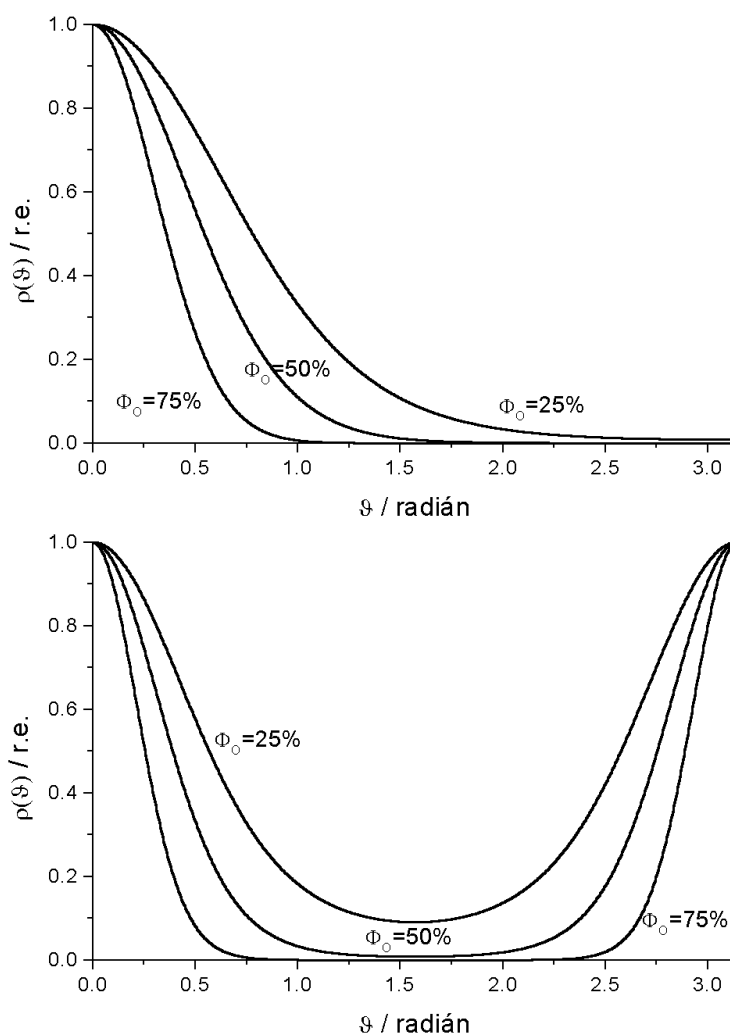
$$\begin{aligned}
 \mu_L^x(t) &\sim \mu^x(t) \sin 2\beta \sin 2\alpha \\
 \mu_L^y(t) &= 0 \\
 \mu_L^z(t) &= 0
 \end{aligned}
 \tag{3.9}$$

Ez azt jelenti, hogy a tökéletesen rendezett minta ideális kísérleti körülményeket biztosít a $\mu^x(t)$ komponens meghatározásához.

3.5 Realisztikus minták

Az előző pontokban tárgyalt tökéletesen orientált és tökéletesen rendezett minták fontos idealizációk voltak, amelyek a realisztikus, Boltzmann-eloszlással terhelt minták megértéséhez jelentenek segítséget. Ezekben a valóságos mintákban a molekulák nem tökéletesen orientáltak/rendezettek: a molekulák szögeloszlását az orientáló/rendező tér hatása és a membránok rotációs diffúziója együttesen alakította ki. A szögeloszlás alakja a Boltzmann-energiaeloszlásból kiindulva adható meg. Az eloszlást jellemző

$\rho(\vartheta)$ szögsűrűség az orientáció/rendezés típusának és mértékének függvénye, ahol ϑ a molekuláris és laboratóriumi z tengelyek által bezárt szög (3.4 ábra).



3.4 ábra. A molekulák szögsűrűsége orientált (felül) és rendezett (alul) minták esetén.

A bonyolultabb szögeloszlás ellenére, szimmetriaokokból következően belátható, hogy (fotoszelekció hiányában) orientált mintákban szintén csak a $\mu^z(t)$ komponens jelentkezik makroszkopikus szinten, a tökéletesen orientált minta esetéhez hasonlóan. Az is látható, hogy (fotoszelekció hiányában) rendezett mintákban nem léphet fel makroszkopikus dipólusmomentum, a tökéletesen rendezett minta esetéhez hasonlóan.

Itt jegyzem meg, hogy a bakteriorodopszin minta esetében alkalmazható kombinált orientálási technikával (permanens elektromos dipólusmomentummal orientálás, majd indukált mágneses dipólusmomentummal rendezés) kialakított

szögsűrűség alapvető szimmetriatulajdonságait tekintve az orientált minta szögsűrűségéhez hasonlítható. Belátható (itt csak a tökéletes rendezés esetére szorítkozva), hogy a tökéletlen kezdeti orientáció miatt a membránok egy része a többivel ellentétes irányba mutat, ami a $\mu^x(t)$ komponens kivételével destruktív szuperpozíciót eredményez a mintában. Így ez az effektus (az ionrelaxáció hatásán túl) további aránytalansághoz vezet a $\mu^k(t)$ komponensek makroszkopikus súlyában.

A fotoszelekció esete:

Amennyiben a minta lehetőséget nyújt a fotoszelekció alkalmazására, a $\mu^x(t)$ és $\mu^y(t)$ komponensek is meghatározhatók.

Az előző pontban leírtak szerint a tökéletesen rendezett mintán makroszkopikusan kizárólag a $\mu^x(t)$ komponens jelenhet meg. Belátható, hogy ezt a tulajdonságát a minta a Boltzmann-eloszlás zavaró hatása ellenére is megőrzi. Ez a rendezés esetére érvényes $\rho(\vartheta)$ szögsűrűség $\vartheta = 90^\circ$ -ra vonatkozó szimmetriájából adódik. Eszerint a mintában minden $\vartheta < 90^\circ$ szöghöz tartozó kromofór kúphoz hozzárendelhető egy $\vartheta > 90^\circ$ szöghöz tartozó kromofór kúp, amely azonos gerjesztési valószínűségű kromofórokhoz tartozik. A mintában található összes molekula csoportosítható úgy, hogy kromofórjaik a fenti értelemben vett kúppárokra essenek. Minden ilyen pár a tökéletesen rendezett minta esetének felel meg, ahol csak a μ_{ij}^x dipólusmomentum komponensek adódnak össze konstruktívan. Így a rendezett mintában is csak az x komponens hoz létre makroszkopikusan detektálható fotofeszültséget. Ez azt jelenti, hogy a rendezett minta – a Boltzmann-eloszlás jelenléte ellenére is - ideális a $\mu^x(t)$ komponens zavartalan meghatározásához.

Komolyabb nehézséget ezek szerint a $\mu^y(t)$ komponens detektálása jelenthet. Ehhez már a minta anizotrópiájának pontosabb ismeretére van szükség.

A molekuláris z tengely laboratóriumi rendszerben vett iránya két szöggel adható meg: a már bevezetett ϑ szöggel és az orientációs tengely körüli forgatás φ szögével. A lineáris kromofór (laboratóriumi koordináta-rendszerben vett) iránya a ϑ és φ szögek mellett egy további γ szöggel adható meg, amely a kromofór $\vec{\mu}_T$ átmeneti dipólusmomentumának a molekuláris z tengely körüli forgatását írja le. A $(\vartheta, \varphi, \gamma)$ irányhoz tartozó kromofór gerjesztési valószínűségére felírhatjuk:

$$p_{\bar{e}}(\vartheta, \varphi, \gamma) \sim [\bar{e} \bar{\mu}_T(\vartheta, \varphi, \gamma)]^2 \quad (3.10)$$

A $(\vartheta, \varphi, \gamma)$ szögekkel jellemzett kromofórokhoz tartozó molekulák a $\rho(\vartheta) \cdot p_{\bar{e}}(\vartheta, \varphi, \gamma)$ mennyiséggel arányos dipólusmomentumot hoznak létre, így a $\mu^k(t)$ függvény l-edik laboratóriumi koordinátatengelyre vett vetületére fennáll:

$$\mu_L^{lk}(t, \vartheta, \varphi, \gamma) \sim \rho(\vartheta) p_{\bar{e}}(\vartheta, \varphi, \gamma) r^{lk}(\vartheta, \varphi, \gamma) \mu^k(t) \quad (3.11)$$

ahol az $r^{lk}(\vartheta, \varphi, \gamma)$ mennyiségek a $(\vartheta, \varphi, \gamma)$ forgatáshoz tartozó mátrix komponensei.

Most vegyük figyelembe a minta összes molekulájának hozzájárulását:

$$\begin{aligned} \mu_L^{lk}(t) &\sim \iiint_{\vartheta\varphi\gamma} \mu_L^{lk}(t, \vartheta, \varphi, \gamma) d\gamma d\varphi d\vartheta \sim \iiint_{\vartheta\varphi\gamma} \rho(\vartheta) p_{\bar{e}}(\vartheta, \varphi, \gamma) r^{lk}(\vartheta, \varphi, \gamma) \mu^k(t) d\gamma d\varphi d\vartheta \sim \\ &\mu^k(t) \int_{\vartheta} \rho(\vartheta) \iint_{\varphi\gamma} p_{\bar{e}}(\vartheta, \varphi, \gamma) r^{lk}(\vartheta, \varphi, \gamma) d\gamma d\varphi d\vartheta \end{aligned} \quad (3.12)$$

amely a következő alakba írható:

$$\mu_L^{lk}(t) \sim \mu^k(t) \cdot f^{lk}(\rho, \bar{e}) \quad (3.13)$$

Így végül a makroszkopikusan mérhető $u^l(t)$ fotofeszültségekre kapjuk:

$$u^l(t) \sim \mu_L^l(t) = \sum_k \mu_L^{lk}(t) \quad (3.14)$$

Az $f^{lk}(\rho, \bar{e})$ mátrix komponens a $\mu^k(t)$ függvény l-edik laboratóriumi tengelyre eső vetületének (előjeles) “súlya”. Az egyes komponensek értékei a minta adott $\rho(\vartheta)$ szögsűrűségének és a gerjesztő fény \bar{e} elektromos térerősségvektorának irányának függvényében numerikus integrálással határozhatók meg.

3.6 A térbeli szuperpozíció számítógépes modellezése

A Boltzmann-eloszlással terhelt minta problémájának kezelésére, az $f^{lk}(\rho, \vec{e})$ együtthatók numerikus úton történő kiszámítására készítettem egy számítógépes programot. A programban az $f^{lk}(\rho, \vec{e})$ együtthatók egy kiterjesztett alakja szerepel, ugyanis lehetőség van a minta (elektródákhoz képesti) elfordulásának figyelembevételére is. Az $[f^{lk}(\rho, \vec{e})]$ mátrixnak a probléma bármely paramétere szerinti függése is lekérdezhető.

A numerikus számítás segítségével egyrészt ellenőrizhetők az elmélet korábban tett megállapításai, másrészt további következtetések vonhatók le a bonyolultabb, Boltzmann-eloszlással terhelt reális minták esetében, ami elsősorban a mérési technika tökéletesítését célozza.

A 3.5a képernyőábra mutatja az ideális esetet: tökéletesen orientált minta, tökéletes rotációs pozicionálás az elektródákhoz képest, a fotoszelekció esete 45°-os polarizációs irány alkalmazásával*. Az ábráról leolvasható a korábban levezetett eredmény, miszerint az $[f^{lk}(\rho, \vec{e})]$ mátrix diagonális, így az egyes $\mu^k(t)$ komponensek elkülönülten jelennek meg az egyes laboratóriumi irányokban.

A valóságban azonban nincs mód tökéletesen orientált minták alkalmazására, ezenkívül a minta rotációs helyzete sem ismert pontosan. A 3.5b képernyőábra mutatja mi történik a tökéletesen orientált minta esetén akkor, ha a minta irányítása pontatlan: a $\mu^k(t)$ dipólusmomentumok "összekeverednek".*

Közelítsünk a gyakorlatban megvalósuló esetekhez: tekintsük a Boltzmann-eloszlással terhelt orientált mintát (3.5c ábra).

*: A 3.5a, 3.5b és 3.5d képernyőábrák bal oldalán, felülről lefelé haladva rendre a következők láthatók: az orientáció (vagy rendezés) típusa és foka, a minta helyzete, a gerjesztő fényimpulzus polarizációs síkja. A jobb oldalon látható fekete téglalapban, függőleges vonalakkal ábrázolt 3x3 mennyiség az $[f^{lk}]$ mátrix. A programban használt jelölés eltér az értekezésben használttól: Σ_{kL} megegyezik az f^{lk} együtthatóval. Továbbá a programban x-szög, illetve y-szög jelöli azon x, illetve y tengely körüli forgatás szögét, amely a minta orientációs irányát a z irányba viszi át, ahol x, y, z a gerjesztő fény terjedési irányával (x) és a -g (függőleges föl) iránnyal (z) definiált koordinátarendszer tengelyeit jelentik.

Elméleti úton megállapítottam, hogy a fotoszelekciós hatásnak, és így a membránsíkba eső $\mu^x(t)$ és $\mu^y(t)$ dipólusmomentumok makroszkopikus kifejeződésének 45°-os polarizációs irány mellett van maximuma a tökéletesen orientált mintában. A 3.5c ábrán látható, hogy ez a tulajdonság a Boltzmann-eloszlással rendelkező minta esetében is megmarad*. Az ábráról leolvasható a minta egy további lényeges tulajdonsága: a laboratóriumi y tengelyen a $\mu^y(t)$ komponens mellett jelen van a $\mu^z(t)$ komponens is, amely a mérést zavarja (a minta tökéletes rotációs pozicionálása mellett is).

A rendezett minta esetét szemléltető 3.5d ábra alátámasztja azt a korábbi megállapítást, amely szerint e minta kiváló lehetőséget ad a $\mu^x(t)$ komponens meghatározására, hiszen ebben az esetben tetszőleges minta irányítás, rendezettségi fok és polarizációs irány mellett is csak ez a komponens jelentkezik makroszkopikus szinten. A fotoszelekciós hatásnak, és így a fotoelektromos mérés érzékenységének ebben az esetben is 45°-os polarizációs irány esetén van maximuma.

A minta rotációs pozicionálása:

A gyakorlatban fellép az a probléma, hogy a minta orientációs iránya nem ismert pontosan (az elektródákhoz képest), ami a dipólusmomentum komponensek "keveredésével" jár. E nemkívánatos hatás megszüntetése közvetlenül lehetséges a mért fotofeszültségek felhasználásával. A számítógépes modell alapján a minta rotációs pozicionálása az alábbi két pont alapján végezhető el:

1. Beállítjuk az x-szög=0° helyzetet az y tengelyen mérhető fotofeszültség minimumának megkeresésével, 0°-os polarizációs irány mellett (3.5e ábra)*.
2. Az x-szög beállítása után az y-szöget is nullázzuk az x tengelyen mérhető fotofeszültség minimumának megkeresésével, szintén 0°-os polarizációs irány mellett (3.5f ábra)*

*: A 3.5c, 3.5e és 3.5f képernyőábrák jobb oldalán, egymás alatt elhelyezkedő három fekete mezőben rendre az x, y és z irányokban (lásd a 3.5a,b,d ábrákhoz tartozó definíciót) jelentkező $\mu^k(t)$ dipólusmomentumok "súlyai" (az f^{lk} komponensek) láthatók valamely mérési paraméter függvényében. Ez a paraméter a 3.5c ábra esetében a polarizátor szöge, a 3.5e és 3.5f ábrák esetében pedig rendre a minta irányítását leíró x-, illetve y-szög a [-90°,90°] intervallumban.

A $\mu^y(t)$ komponens meghatározása:

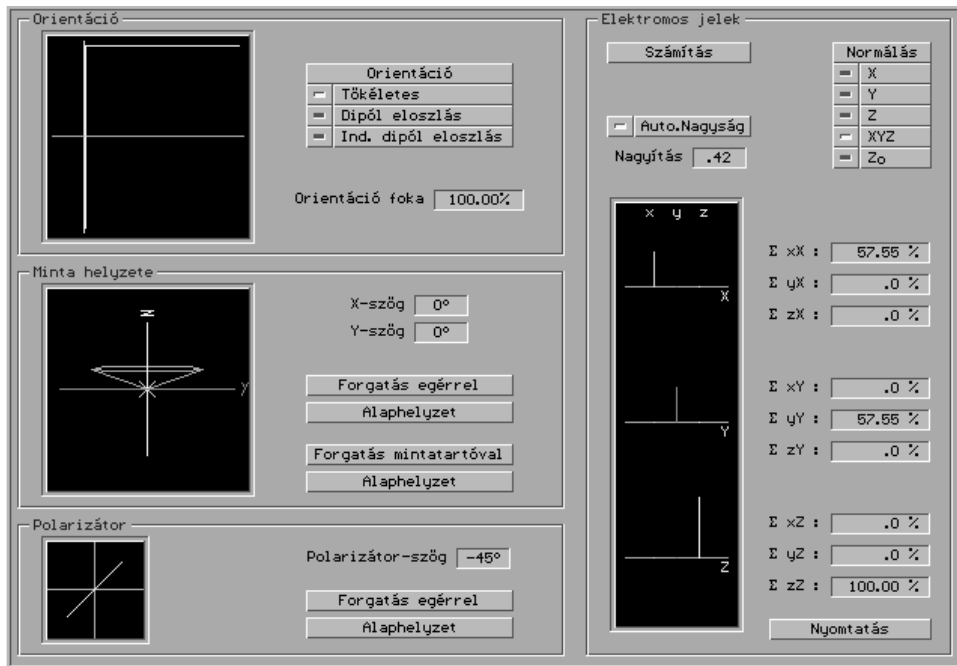
A szimuláció többek között megmutatta, hogy (a tökéletesen orientált minta esetével megegyezően) a Boltzmann-eloszlással terhelt orientált mintában is $\alpha=45^\circ$ fok mellett maximális a fotoszelekciós hatás. Ugyanakkor, mint már említettem – a tökéletesen orientált mintával ellentétben - a laboratóriumi y tengelyen a $\mu^y(t)$ mellett megjelenik a $\mu^z(t)$ komponens is.

$$u^y(t) \sim \mu_L^y(t) \sim f^{yy} \mu^y(t) + f^{yz} \mu^z(t) \quad (3.15)$$

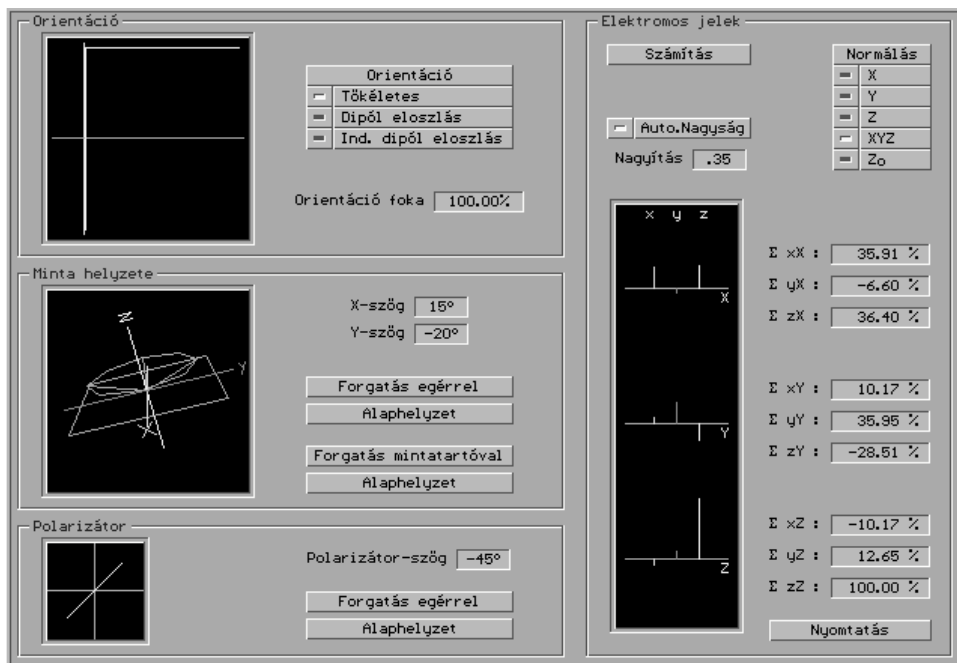
A $\mu^y(t)$ dipólusmomentum meghatározása tökéletesen orientált minta esetén egyszerűen történik. Ha a minta irányítása pontos, akkor az y irányban mérhető $u^y(t)$ fotofeszültség arányos $\mu^y(t)$ -vel, és 45° -os polarizációs iránynál maximuma van. Ha az orientáció nem tökéletes, akkor több mérésre van szükség ahhoz, hogy megkapjuk $\mu^y(t)$ alakját. Itt megadok egy eljárást, amellyel a $\mu^y(t)$ komponens meghatározható. Gerjesszük a mintát két (α_1, α_2) polarizációs szög mellett, és mérjük az ezekhez tartozó $u^{y_1}(t)$ és $u^{y_2}(t)$ fotofeszültségeket. A minta pontos rotációs pozicionálása esetén az y tengelyen nem jelentkezhet a $\mu^x(t)$ dipólusmomentum hatása. A fizikai szempontból érdektelen arányossági tényezőket elhagyva felírható az alábbi egyenletrendszer:

$$\begin{aligned} u^{y_1}(t) &= M^y(t) + M^z(t) \\ u^{y_2}(t) &= aM^y(t) + bM^z(t) \end{aligned} \quad (3.16)$$

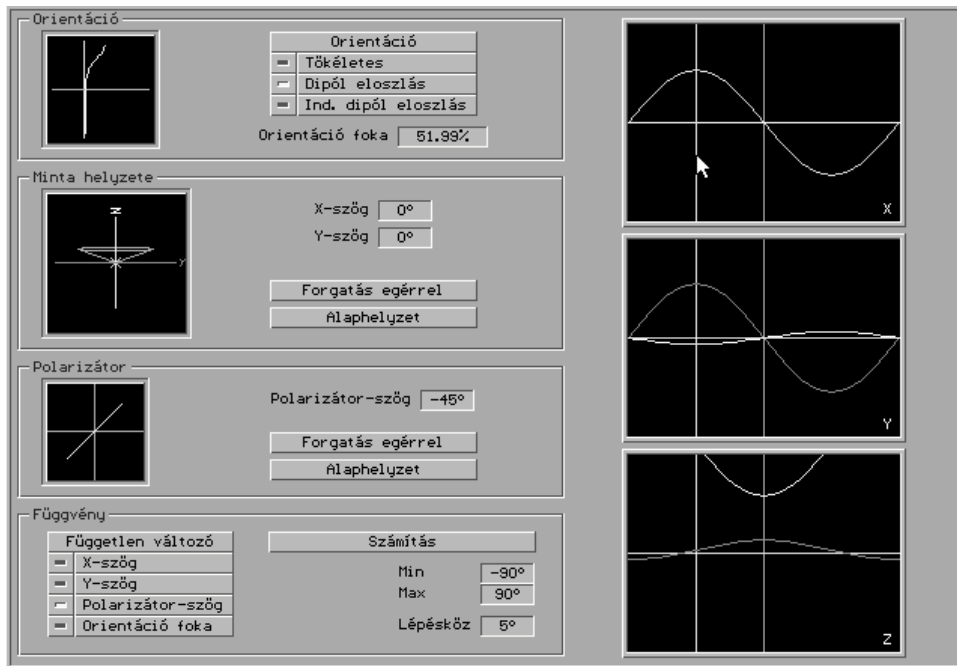
ahol $\mu^k(t) \sim M^k(t)$, az $a = \frac{f_2^{yy}}{f_1^{yy}}$ és $b = \frac{f_2^{yz}}{f_1^{yz}}$ faktorok numerikus integrálással meghatározhatók a minta szögeloszlásának és a gerjesztő fény polarizációs síkjának ismeretében. A fenti egyenletrendszerből $M^y(t)$ kifejezhető. (Az $M^y(t)$ és $\mu^y(t)$ közötti arányosság nem jelent információvesztést, tekintve, hogy az egyes $\mu^k(t)$ komponensek egyébként is csak egy határozatlan szorzófaktor erejéig határozottak.)



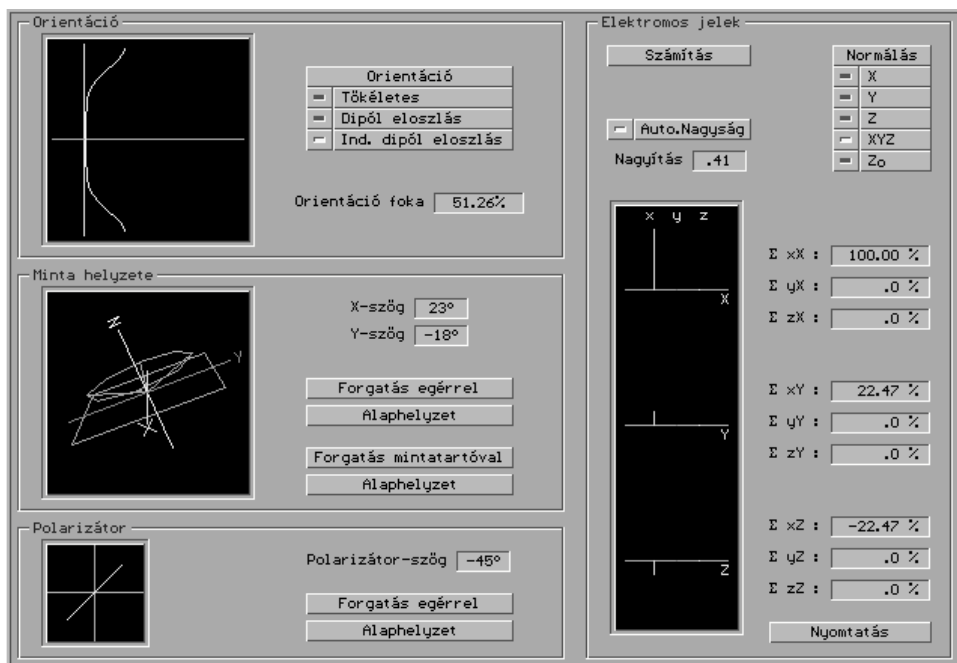
3.5a ábra. Az ideális eset.



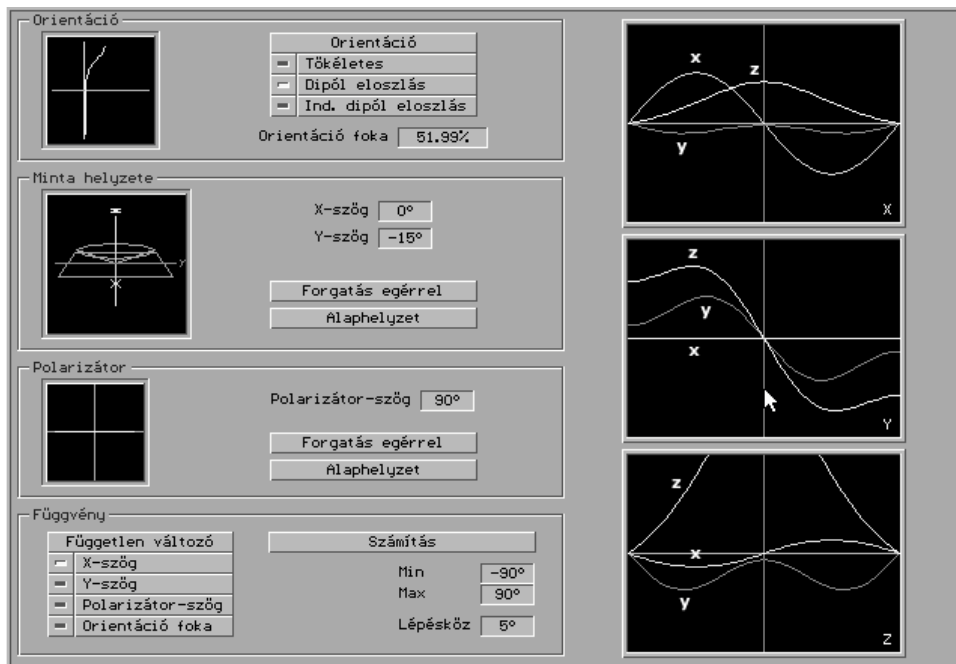
3.5b ábra. A minta pontatlan rotációs pozicionálása a komponensek keveredésével jár.



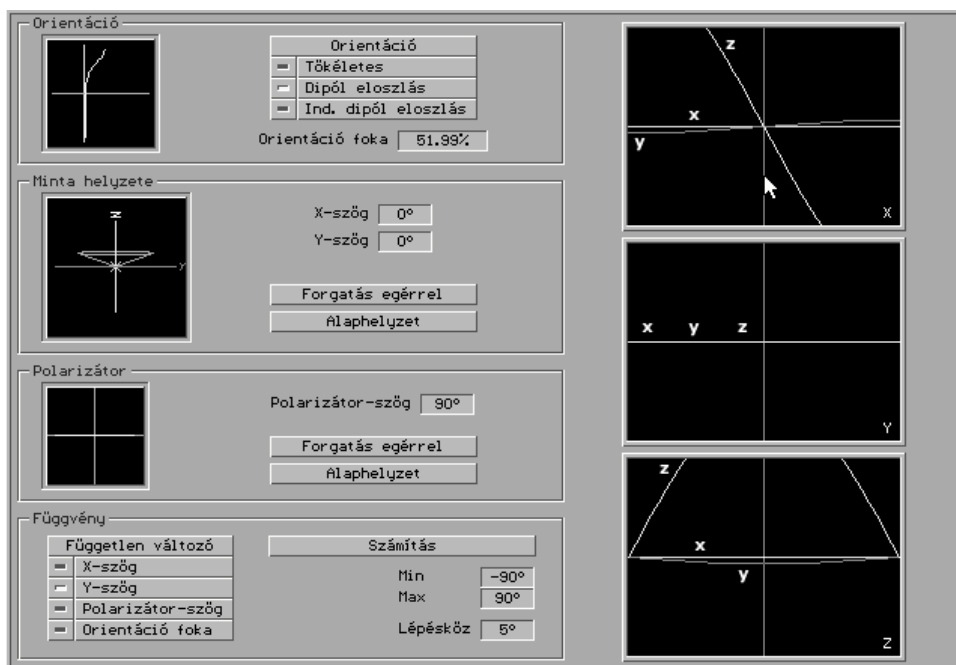
3.5c ábra. A fotoszelekciós hatás 45° -os polarizátor állás mellett maximális a nem tökéletesen orientált mintában is.



3.5d ábra. A rendezett mintában kizárólag az x komponens mérhető.



3.5e ábra. A minta rotációs pozicionálása a fotofeszültség felhasználásával I.



3.5f ábra. A minta rotációs pozicionálása a fotofeszültség felhasználásával II.

3.7 Dipólusmomentumok detektálása

Képzeljük magunk elé a kocka alakú mintát, amelynek geometriai középpontja a laboratóriumi koordinátarendszer origója, lapnormálisai a laboratóriumi koordinátatengelyeken fekszenek. Vegyük körül a mintát szimmetrikusan, a laboratóriumi koordinátarendszer tengelyei mentén elhelyezett elektródapárokkal.

Megtehető, hogy a mintát olyan térfogatelemekre osztjuk, amelyekre fönnáll a következő két tulajdonság: 1. a térfogatelem makroszkopikus számú molekulát tartalmaz, 2. a térfogatelem mérete elhanyagolhatóan kicsi a minta méreteihez képest. Indítsuk el a mintában a vizsgált molekuláris folyamatot a $t=0$ időpontban (pl. a bakteriorodopszin esetében fényimpulzussal). Ekkor mindegyik (a fenti értelemben vett) térfogatelemben megjelenik egy - mindegyik térfogatelemre azonos - $\mu_V^l(t)$ dipólusmomentum. A mintát körülvevő elektródák az egyes térfogatelemektől származó $\mu_V^l(t)$ dipólusmomentumok térbeli szuperpozícióját érzékelik. A mérési elrendezés szimmetriáját szem előtt tartva belátható, hogy pl. az x irányban elhelyezett elektródák között definiált $u^x(t)$ potenciálkülönbség nem függhet a $\mu_V^y(t)$ vagy $\mu_V^z(t)$ komponensektől, hanem csak a $\mu_V^x(t)$ mennyiségnek lehet függvénye, továbbá fennáll az $u^x(t) \sim \mu_V^x(t)$ arányosság. Általánosan tehát felírható az adott elektródapárral mért $u^l(t)$ feszültségre, hogy:

$$u^l(t) \sim \mu_V^l(t) \sim \mu_L^l(t) \sim \sum_k f^{lk}(\rho, \vec{e}) \mu^k(t) \quad (3.17)$$

Ha a mért $u^l(t)$ fotofeszültségekből származtatjuk a $\mu^k(t)$ függvényeket és az $x_i(t)$ intermedier-koncentrációk ismertek, akkor a (3.4) összefüggés alapján számolhatók a μ_i^k intermedier dipólusmomentumok. Tudjuk, hogy a μ_i^k értékek csak egy ismeretlen - a három térbeli irány esetében más és más - szorzófaktor erejéig határozottak, az ionrelaxációs folyamat anizotrópiája és a minta anizotrópiás minősége miatt. Ennek ellenére a μ_i^k értékek értékes információt hordoznak a molekula működésére nézve, mivel az adott irányú μ_i^k komponensek relatív nagyságai mindenképpen összevethetők

egymással, és így összehasonlíthatók (pl. molekuladinamikai számításokból adódó) elméleti értékekkel.

Az $x_i(t)$ intermedier-koncentrációkat valamilyen kísérleti vagy elméleti forrásból ismernünk kell. (Bakteriorodopszin esetében ez a forrás a fotociklust kísérő abszorpciókinetikai mérés és a megfelelő adatkiértékelés.)

3.8 Dipólusmomentum-járulékok

A μ_i^k értékek helyes értelmezéséhez látni kell, hogy egy adott átmenethez tartozó dipólusmomentum-változás a molekula konformációs változásából eredő töltésátrendeződésből, és az opcionális töltéstranszportból (proton vagy más ion) származó hatás szuperpozíciója. A konformációs változásból eredő járulékkal kapcsolatban kiemelem, hogy a molekulában és a molekula környezetében lévő, rotációs mozgásukban korlátozott vízmolekulákat, mint parányi dipólusokat is figyelembe kell venni, amikor egy adott intermedier dipólusmomentumát kiszámítjuk. A vízmolekulák elektromos térbeli orientációjáról feltételezhető, hogy jelentősen gyorsabb az ionrelaxációs folyamatoknál, ezért hatásuk kezelhető olyan módon, hogy az ionrelaxációt generáló térszerkezeti változások részeként értelmezzük őket.

Amennyiben a tanulmányozott molekuláris folyamat ciklikus, a (3.4) reláció teljes folyamatra vett időintegráljára a következő adódik:

$$\int_{\text{folyamat}} \mu^k(t) dt \sim \sum_{i=0}^n \mu_i^k \int_{\text{folyamat}} \frac{d}{dt} x_i(t) dt = \mu_n^k - \mu_0^k, \quad (3.18)$$

Ezt a kifejezést nullának gondolhatnánk, mivel a folyamat ciklikussága értelmében az utolsó (n-edik) intermedier a kiindulási (nulladik) intermedierrel azonos. Ez így is van, ha a fehérje nem transzportál töltést, ellenkező esetben azonban a μ_n^k dipólusmomentum különbözik a μ_0^k -tól a transzportált töltés járuléka miatt. Amennyiben a töltés molekulán belül vett teljes elmozdulása a transzport folyamat során d^k , akkor belátható:

$$\int_{\text{folyamat}} \mu^k(t) dt \sim \mu_n^k - \mu_0^k = qd^k \quad (3.19)$$

Ezen összefüggés felírásának feltétele, hogy a transzportált töltés elektrolitbeli diffúziója nem elektrogén a mérési rendszerben.

Ha a szuszpenziós módszerrel végzett mérésekből számított dipólusmomentumokat módunkban áll térszerkezetekből számított értékekkel összevetni, akkor a fentieket figyelembe kell vennünk. Ennek praktikus módja, hogy a térszerkezetek dipólusmomentumainak számításánál a transzportált töltést a molekulába való belépése előtti, és a molekulából való kilépése utáni intermedierek esetében a felületre "ragasztjuk" a belépés, illetve kilépés helyén.

3.9 Megjegyzések

A (3.19) arányosságból következik, hogy töltéstranszportáló transzmembrán fehérjék esetén a $\mu^k(t)$ komponensek idő szerinti integrálja arányos az átpumpált töltéssel (proton vagy más ion). Ilyen módon definiálható a vizsgált folyamat pumpálási hatásfoka (Keszthelyi és Ormos, 1989; Dér és mt., 1989; Dér és mt., 1991).

Megjegyzem, hogy alacsony ionerősség esetén, speciális puffermolekulák jelenlétében, az elektromos jeleket további komponensek torzíthatják el, ahogy azt bR esetében többen megmutatták (Marinetti, 1987; Liu és mt., 1990; Tóth-Boconádi és mt., 2000). Az itt bemutatott elméleti leírás olyan körülmények között érvényes, ahol a puffermolekuláknak a fotofeszültség alakjára gyakorolt hatása elhanyagolható. Ez a feltétel biztosan teljesül, ha a sókoncentráció meghalad egy kritikus értéket (hozzávetőlegesen 20 mM/l egyértékű, 3 mM/l kétértékű kationok esetében) (Liu, 1990).

A leírás további implicit feltételezése volt, hogy a fotoszelekciós mérések alatt a fényvel való gerjesztés nem a telítési tartományban történik. Ekkor a fotofeszültségek arányosak a gerjesztő fény intenzitásával.

A fejezetben kifejtett elmélet alkalmazásához a fenti feltételeket a mérések kivitelezése során figyelembe kell vennünk.

4. A MÉRÉSI MÓDSZER ALKALMAZÁSA

Ez a fejezet a szuszpenziós módszer előzőekben vázolt elméletének egy konkrét fizikai rendszerre, a bakteriorodopszinra való alkalmazását tartalmazza. A protonpumpa működését kísérő elektromos és abszorpciókinetikai változások ismeretében, az elmélet alapján következtetések vonhatók le a membránfehérjén belüli töltésátrendeződésekre nézve. A kvantitatív kiértékelési módszernek köszönhetően lehetséges molekuladinamikai modellek érvényességét vizsgálni, a modellek által megadott térszerkezetekből számítható dipólusmomentumok és a fotoelektromos mérésekből származó értékek összehasonlításával.

4.1 Adatkiértékelés

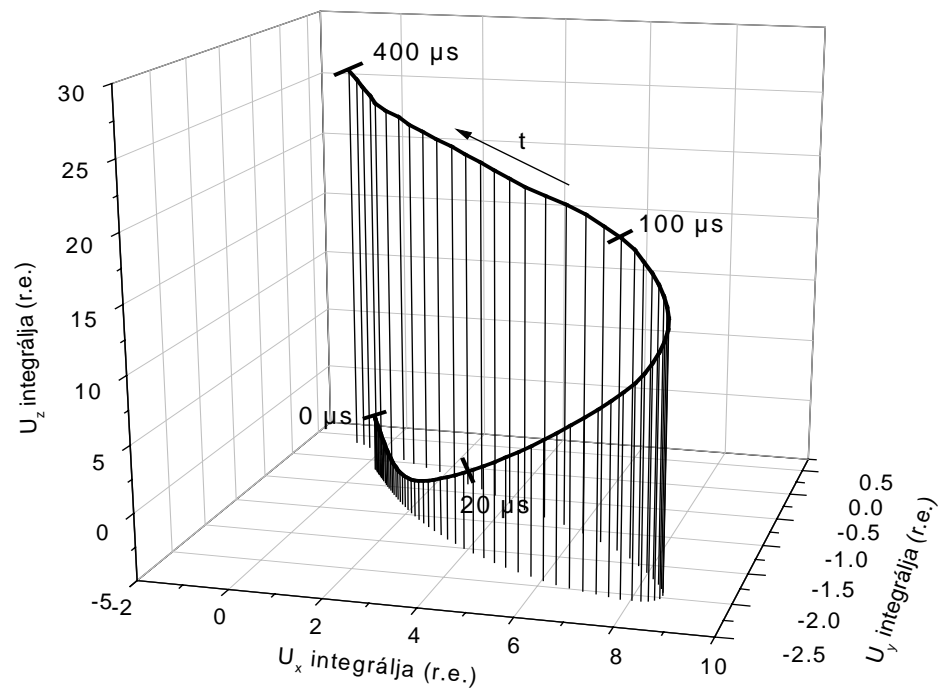
A bakteriorodopszin mintán (2.1 pont) fotoelektromos és abszorpciókinetikai mérések történtek már részletezett kísérleti elrendezésben (2.2 pont) és mérési eredményekkel (2.3 pont).

A minta tulajdonságai, a mérési elrendezés geometriája és az előző fejezetben kifejtett elméleti megfontolások alapján a mért $u^k(t)$ fotofeszültségek (2.1 ábra) arányosak a $\mu^k(t)$ dipólusmomentum komponensekkel. (A mérésekhez használt minta esetében az ún. orientációs függvény értéke - a 23T nagyságú mágneses rendező tér alkalmazásával - az ideális 1-hez közeli értéknek adódott mágneses kettőtöréses mérések alapján (Dér és mt., 1995a).) Ezen arányosság felhasználásával, a (3.4) összefüggés integrálásából a következő adódik:

$$\int_0^t u^k(t') dt' \sim \sum_i \mu_i^k x_i(t) \quad (4.1)$$

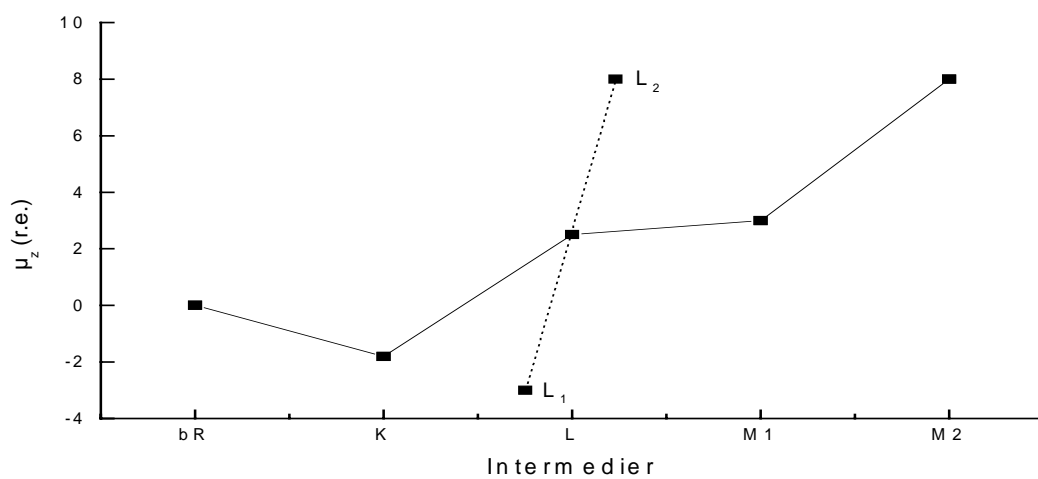
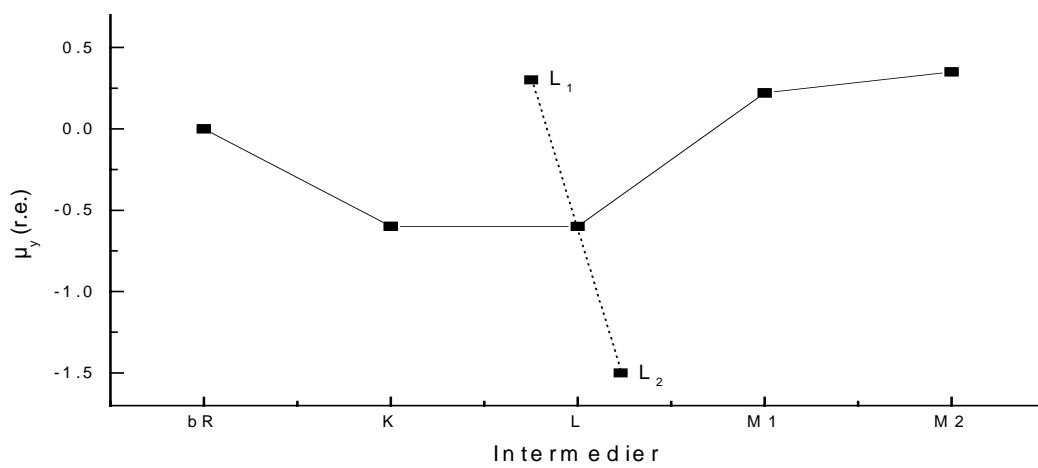
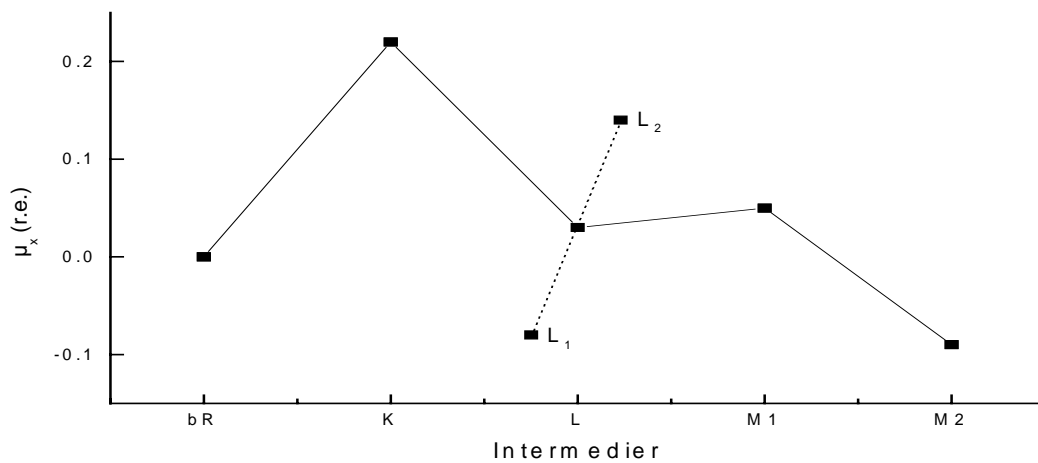
Azaz ha a mért fotofeszültség-vektor bármely térbeli komponensét integráljuk, akkor olyan függvényt nyerünk, amely arányos a mintában lévő intermedierek teljes dipólusmomentumának adott térbeli komponensével.

Ha az integrálást mindegyik térbeli komponensre elvégezzük, és a három időfüggvényt térbeli görbéként ábrázoljuk az idő, mint paraméter függvényében, akkor szemléletes képet kapunk az intermedierek teljes dipólusmomentumának alakulásáról a fotociklus során (a függvény az x,y és z irányokban eltérő, ismeretlen szorzófaktorok erejéig határozott). Az így definiált görbe (4.1 ábra) a mintában jelenlévő intermedierek arányainak megfelelően súlyozott, "elkent" görbe. Az egyes intermedierekhez rendelhető diszkrét dipólusmomentumok kiszámításához szükség van az $x_i(t)$ intermedierek-koncentrációk ismeretére. Ezt az információt az abszorpciókinetikai mérések szolgáltatják (2.3 pont).



4.1 ábra. Az intermedierek teljes dipólusmomentuma a bakteriorodopszin fotociklusa során.

A fotofeszültség-függvényeknek az intermedierek-koncentrációk időbeli deriváltjaival vett multilineáris regressziós illesztése alapján adódnak az intermedierek dipólusmomentumai (a (3.4) reláció szerint). Az alapállapothoz viszonyított intermedierek dipólusmomentumok a 4.2 ábrán láthatók.



4.2 ábra. A fotoelektromos mérés alapján számított dipólusmomentumok.

A kapott információ molekuláris koordinárendszerben való szemléletes értelmezéséhez tekintsük a következőket:

- A μ_i^z dipólusmomentum pozitív irányú megváltozása egy, a pumpálás irányába elmozduló pozitív töltésnek felel meg.
- A μ_i^y dipólusmomentum pozitív irányú megváltozása egy, a retinál átmeneti dipólusmomentumának a membrán síkjára eső vetületével párhuzamosan, az E hélixről az A hélix felé elmozduló pozitív töltésnek felel meg.
- A μ_i^x dipólusmomentum pozitív irányú megváltozása az előbbi két irányra merőlegesen, a C hélixről az F hélix felé elmozduló pozitív töltésnek felel meg.

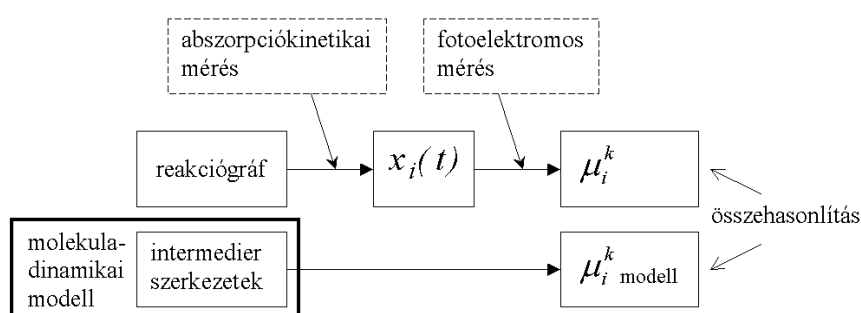
A fotoelektromos mérés alapján kapható dipólusmomentumokkal kapcsolatban ezen a helyen is megjegyzem, hogy azok csak egy ismeretlen szorzófaktor erejéig határozottak, amely a tér x,y és z irányában más és más. Megjegyzem azt is, hogy az itt bemutatott dipólusmomentum értékek több okból kifolyólag közelítő érvényűek. Egyrészt a fotociklus kinetikai modellje nem adható meg kizárólagos módon, csak bizonyos feltételezések árán. Ilyen feltételezés az intermedierek közti kémiai reakciók elsőrendűsége (Nagle, 1991), a számított intermedier-spektrumokra vonatkozó fizikailag megalapozható korlátozások és a fotociklus reakciógráfiájának rögzítése (Dér és mt., 1992b; Ludmann és mt., 1998). A szuszpenziós módszer elméleti leírásánál említettekén és az itt leírtakon kívül a mérési hibák alkotják együtt a dipólusmomentum értékek bizonytalansági forrásait.

Az intermedier dipólusmomentumok (3.4) alapján történő kiszámításának feltétele, hogy az ionrelaxációs folyamatok a vizsgált intermedierek élettartamaihoz mérten gyorsan játszódjanak le. Az elektrolit dinamikai modellezésével kiderült (6. fejezet), hogy a szuszpenziós módszer tipikus kísérleti körülményei között az ionrelaxációs folyamatok időállandója hozzávetőlegesen a 10 ns nagyságrendjébe esik. Ebből adódik, hogy a feltétel nem teljesül a K állapotba ps-os időállandóval elbomló bR alapállapot esetén. Ennek ellenére megmutatható, hogy a bR → K átmenethez tartozó dipólusmomentum-változásra mégis kvantitatív módon lehet következtetni a fotofeszültség-függvény integráljából kiindulva, az ionrelaxáció más tulajdonságait (linearitás, intramembrán részletekre való érzéketlenség, részletesebben a 6. fejezetben) kihasználva.

4.2 Molekuladinamikai modellek tesztelése

Mint azt korábban már említettem, a fotoelektromos mérés alapján nyert intermedier dipólusmomentumok lehetővé teszik molekuladinamikai számításokból származó térszerkezetek közvetlen ellenőrzését.

A kiértékelési folyamatot a 4.3 ábra szemlélteti. Az ábrán szereplő reakciógráf az egyes intermedierek közötti folyamatok létezésére, irányára vonatkozó információkat tartalmazza.



4.3 ábra. Molekuladinamikai modellek ellenőrzése a fotoelektromos mérés alapján.

Az elméleti fizikai módszerek és a számítástechnika fejlődése lehetővé tette, hogy bakteriorodopszin nagyságú molekulákon molekuladinamikai számításokat végezzenek. Miután az alapállapotban lévő bR atomi felbontású szerkezete elektrondiffrakciós mérésekből kiindulva ismertté vált (Henderson és mt., 1990), a térszerkezetre alapozva megkísérelték a fotociklus folyamatainak modellezését (Humphrey és mt., 1995; Xu és mt., 1995; Scharnagl és mt., 1994; Engels és mt., 1995). A bR működésére vonatkozó néhány kísérleti adat (pK értékek, Fourier-transzformált IR mérések) figyelembevételével, és bizonyos fizikailag megokolható feltételezések alapján az L, M intermedierek térszerkezeteit is publikálták.

Az atomi koordináták és parciális töltések felhasználásával kiszámítottuk a megfelelő μ_i^k értékeket két molekuladinamikai modell esetében (C. Scharnagl és K. Schulten kutatókkal történt személyes kommunikáció alapján). A számítások figyelembe veszik a bR molekula környezetében lévő vízmolekulákat is.

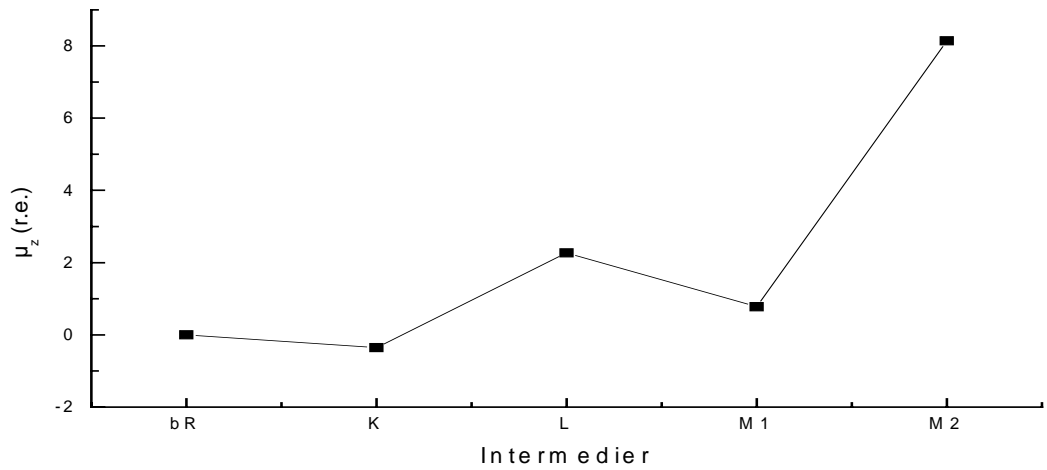
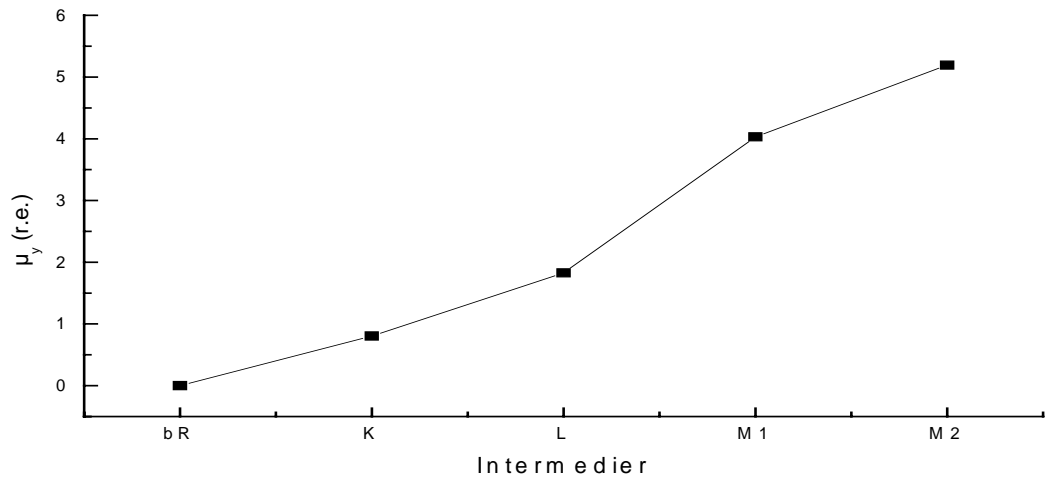
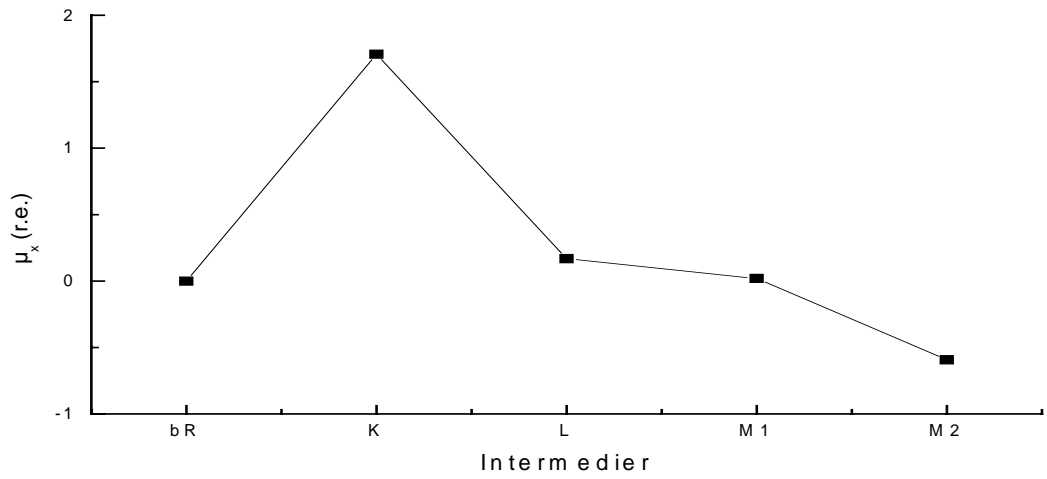
A Schulten f3ele kutat3csoport 3ltal megjelentetett publik3ci3 (Humphrey 3s mt., 1995; Xu 3s mt., 1995) adatb3zisa tartalmazza a K intermediert is, viszont az 3ltaluk haszn3lt modellben csak egy L intermedier szerepel. A fotoelektromos m3r3sb3l sz3armaz3 3redm3nyek ezen adatb3zissal val3 k3zvetlen 3sszevethet3s3ge c3lj3b3l, az alkalmazott reakci3gr3fban szerepl3 L intermedierekhez tartoz3 dip3lusmomentumok 3tlag3t vett3k 3sszehasonl3t3si alapk3nt.

A ki3rt3kel3s sor3n az 1 μ s-400 μ s id3tartom3nyra szor3tkoztunk, emiatt a Scharnagl-modell eset3ben az L_1 , L_2 , M_1 , M_2 intermediereket, a Schulten-modell eset3ben a K , L , M_1 , M_2 intermediereket vessz3k tekintetbe.

A Scharnagl-modell nem adja meg a K intermedier t3rszerkezet3t, 3gy ez az anal3zisben nem szerepelhet. A k3t molekuladinamikai modell 3ltal megadott intermedier t3rszerkezetek alapj3n sz3m3tott μ_i^k dip3lusmomentumokat 3s a fotoelektromos m3r3s alapj3n kapott 3rt3keket a 4.1 t3bl3zat tartalmazza, a 4.4 3bra grafikus form3ban mutatja be a Schulten-modell alapj3n sz3m3tott intermedier dip3lusmomentumokat.

Forr3s	Intermedier dip3lusmomentum (relat3v egys3g)			
	K	L	M ₁	M ₂
Schulten 3s munkat3rsai	x 1.70 y 0.80 z -0.35	x 0.17 y 1.83 z 2.27	x 0.02 y 4.03 z 0.78	x -0.59 y 5.19 z 8.13
Scharnagl 3s munkat3rsai	x - y - z -	L ₁ L ₂ x 5.07 0.56 y 5.28 14.0 z 0.10 11.5	x 1.41 y 7.85 z -0.27	x 3.69 y 4.00 z 6.59
Fotoelektromos m3r3s	x 0.22 y -0.6 z -1.8	x 0.03 y -0.6 z 2.5	x 0.05 y 0.22 z 3.0	x -0.09 y 0.35 z 8.0

4.1 t3bl3zat. Az intermedierek dip3lusmomentumai a molekuladinamikai t3rszerkezetek 3s a fotoelektromos m3r3s alapj3n.



4.4 ábra. A Schulten-modell alapján számított dipólusmomentumok.

A 4.1 táblázat és a megfelelő ábrák (4.2 és 4.4) dipólusmomentumai az alapállapot dipólusmomentumára relatívák (az alapállapot dipólusmomentumát nullának választjuk). A szuszpenziós módszer elméleti megalapozása során láttuk, hogy a fotoelektromos mérésből kapható intermedier dipólusmomentumok csak egy ismeretlen szorzófaktor erejéig határozottak, amely a tér x,y és z irányában más és más lehet.

4.3 Diszkusszió

Az abszorpciókinetikai méréssel összhangba hozható legegyszerűbb fotociklus-modell két L (L_1 és L_2) és két M (M_1 és M_2) intermedier feltételezését kívánta meg. Az L_2 intermedier gyors egyensúlyban van az M_1 intermedierrel. Egyetlen L intermedierrel történő illesztés jelentősen rosszabb eredményt adott volna, korábbi megfigyelésekkel összhangban (Dér és mt., 1992b; Zimányi és Lányi, 1993; Gergely és mt., 1993). A gyors L_2 - M_1 egyensúly miatt ezen intermedier-koncentrációk időbeli lefutása hasonló, ami a megfelelő dipólusmomentumok hibáiban tükröződik. Ennek ellenére az eredmények összhangban állnak korábbi kísérleti adatokkal (Ludmann és mt., 1998), valamint a fotociklus kezdeti eseményeinek (a K intermedierig tartó) molekuladinamikai szimulációival (Humphrey és mt., 1995).

Ahogy már említettem, az elektromos mérésekből nyerhető μ_i^k intermedier dipólusmomentumok csak egy, a tér három irányában eltérő, ismeretlen szorzófaktor erejéig adottak. Ez a szorzófaktor a minta anizotrópiás minőségének (a fehérjék szögeloszlásának) és - az ionrelaxáció kapcsán - a membránfragmentumok geometriai és elektromos paramétereinek, az elektrolit összetételének, hőmérsékletének függvénye. Ebből adódóan a kísérletileg nyert μ_i^k értékek nem vethetők össze közvetlenül a molekuladinamikai modellek által adott fehérjeszerkezetekből számítható értékekkel. Mégis, a μ_i^k mennyiségek jelentős információ tartalommal rendelkeznek, hiszen egy adott koordináta-tengely menténi relatív nagyságaik már összevethetők a molekuladinamikai modellekből számítható megfelelő relatív nagyságokkal. Elég csak arra gondolni, hogy az egyes intermedierek dipólusmomentumai között – csak egy koordinátát számolva is - jelentős számú “nagyobb, mint” reláció értékelhető ki. Ezen

relációk elméleti és kísérleti változatainak összehasonlításából már önmagában igen megbízható következtetés vonható le a két rendszer hasonlóságára nézve.

A kísérleti és elméleti úton nyert dipólusmomentumok bizonytalanságában potenciálisan szerepet játszó számos körülményre való tekintettel, figyelemre méltó egyezést állapíthatunk meg az x-z síkban vett normalizált dipólusmomentumok esetében (4.2 és 4.4 ábrák).

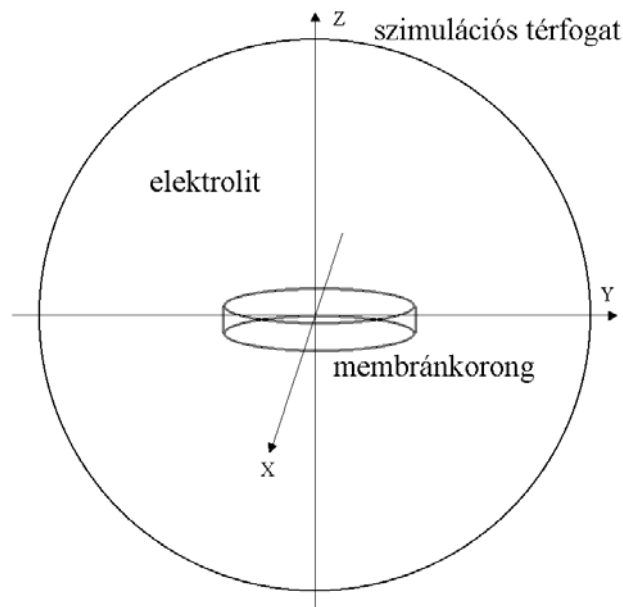
Mindezek alapján remélhető, hogy az elméleti és kísérleti technikák tökéletesedése nyomán, módszerünkkel kiválasztható lesz a bR protonpumpa működését helyesen leíró molekuladinamikai modell. Egy ilyen modell alapvető tudományos jelentőséggel bírna, hiszen egy ionpumpa molekuláris szintű leírását jelentené.

Ma már a bakteriorodopszin köztes állapotainak esetében is rendelkezésünkre állnak kísérletekből (röntgendiffrakciós mérések) nyert térszerkezeti adatok (Pebay-Peyroula és mt., 1997; Sass és mt., 2000; Lanyi és mt., 2001), amelyek várhatóan új lendületet adnak a molekuladinamikai modellezéshez. A kísérleti úton meghatározott térszerkezetek ugyanis kiindulási alapként szolgálnak az elméleti számításokhoz, amelyekben igyekeznek a fehérje realisztikus viszonyainak (fiziológias hőmérséklet, természetes lipidkörnyezet, közeli vízmolekulák helyzete) megfelelő térszerkezetekhez eljutni. Amennyiben megszületnek ezen új, javított intermedier térszerkezetek, tervezzük a belőlük számítható dipólusmomentumok összehasonlítását a fotoelektromos mérésekből nyerhető értékekkel.

5. IONRELAXÁCIÓ – MODELL ÉS IMPLEMENTÁCIÓ

5.1 Az ionok mozgásegyenletei

Az elektrolit modellezése az ún. szimulációs térfogatban, mint tartályban történik. Az elektrolit körülveszi a szimulációs térfogat közepén elhelyezkedő membránkorongot, amely felületi töltésekkel és intramembrán dipólusokkal rendelkezhet (5.1 ábra).



5.1 ábra. A szimulációs rendszer.

A modellben az ionokat tartalmazó víz mechanikai és elektromos szempontból mint homogén kontinuum szerepel, amit a későbbi formulákban a η_w homogén viszkozitási együttható és az ε_w homogén dielektromos állandó fejez ki. Az egyes szimulációk kezdetekor az ionok véletlenszerűen helyezkednek el a szimulációs térfogatban. Az elektrolit időbeli állapotait egymástól Δt lépésköz (időfeloldás) választja el. Az elektrolit adott időpontbeli állapota mindig az előző időpontbeli állapotból áll elő a "szimulációs algoritmus" részben (lásd később) leírtak szerint. A Δt idő természetesen sokkal rövidebb, mint a modellezni kívánt fizikai folyamat karakterisztikus ideje,

másfelől a $\gamma_i \Delta t \gg 1$ feltétel (1.4 pont) is teljesül rá. Az (1.2) képlet szerint, amennyiben a rendszerben szisztematikus erőként csak az elektromos erő van jelen, az i -edik ion elmozdulása Δt idő alatt a következő elektromos (Coulomb) és Brown részből tevődik össze:

$$\Delta \vec{r}_i = \Delta \vec{r}_i^E + \Delta \vec{r}_i^B \quad (5.1)$$

A Coulomb-tag tartalmazza a rendszerben lévő összes többi ion, valamint a membrán töltéseinek hatását, és a következő alakban adható meg:

$$\Delta \vec{r}_i^E = \mu_i q_i \vec{E}(\vec{r}_i) \Delta t \quad (5.2)$$

ahol $\mu_i = \frac{1}{m_i \gamma_i}$ az i -edik ion mobilitása, q_i a töltése, $\vec{E}(\vec{r}_i)$ az elektromos térerő az \vec{r}_i

helyen. $\vec{E}(\vec{r}_i)$ -t a rendszerben lévő összes többi q_j töltés hozza létre, azaz a többi ion, a membrán felületi töltései és intramembrán dipólusai:

$$\vec{E}(\vec{r}_i) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_w} \sum_j q_j \frac{\vec{r}_i - \vec{r}_j}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|^3} \quad (5.3)$$

A modell nem veszi figyelembe a membrán által okozott dielektromos heterogenitás miatt fellépő indukált töltések hatását. Ez egy közelítés, amely arra a tényre alapozható, hogy a membrán egy vékony objektum (5 nm) összehasonlítva a szimulációs térfogat mezoszkopikus méretével (kb. 100 nm átmérő), amelyben az ionrelaxáció lejátszódik.

Az i -edik ion elmozdulása a Brown-mozgás következtében az alábbi alakban írható fel:

$$\Delta \vec{r}_i^B = \sigma_i \sum_k r_k^{SD} \vec{e}_k \quad (5.4)$$

itt $\sigma_i = \sqrt{2D_i \Delta t}$, $D_i = \mu_i kT$ az i -edik ion diffúziós együtthatója, \vec{e}_k a k -edik térbeli egységvektor, r_k^{SD} egy véletlenszerű minta a standard normális eloszlásból.

5.2 Geometriai vonatkozások, ütközések

A részecskék ütközésének kezelésére hagyományosan használt taszító potenciálok helyett a modellben geometriai eljárásokat érvényesíttek. Így az ion-ion átfedéseket egy sztochasztikus átfedéskizáró algoritmussal, az ion-membrán ütközéseket egy reflexiós algoritmussal kezeltem.

A modellben az ion geometriailag mint gömb szerepel, amelynek sugarát az alábbi hidrodinamikai sugár definiálja:

$$r_i = \frac{1}{6\pi\eta_w\mu_i} \quad (5.5)$$

ahol η_w az elektrolit viszkozitási együtthatója.

A szimuláció során, az ion-ion és ion-membrán távolságokat a fenti sugár szerint korlátozom. Amennyiben két ion közt a távolság - az elektromos és Brown elmozdulások kiszámítása után - kisebbnek adódik, mint a két ion sugarának összege, az "ionátfedés-kezelőt" alkalmazom. Ez az algoritmus véletlenszerű irányban széttolja a részecskéket. A szimulációkban alkalmazott <1mM koncentrációtartományban az ion-ion átfedések igen ritka események, így az átfedéskezelő algoritmus konkrét megvalósítása nem érdemel különösebb figyelmet. Ionok membránokkal való közeli kölcsönhatásának modellezésére szintén bizonyos taszító potenciálok használata terjedt el. Ez a modell a membránt ütközési szempontból reflexiós felületekkel rendelkező geometriai objektumként kezeli. Gondolhatnánk, hogy egy jól megtervezett ütközési algoritmus esetleg lehetővé tenné durvább időfeloldások használatát, és ezáltal kisebb szimulációs időigényhez vezetne. Azonban a rendszerben működő Coulomb-erők hiteles modellezése a Δt szimulációs lépésköz növelése elé mindenképpen akadályt gördít. Esetünkben ez a felső határ tipikusan 1 ns-hoz közeli érték. Így az ion teljes elmozdulás-vektorának egyszerű reflexióját alkalmazom ütközési algoritmusként. Ellenőrző méréseim szerint (amint arról később részletesen szó lesz), ez az algoritmus kielégítő pontossággal működik az alkalmazott szimulációs lépésköz mellett.

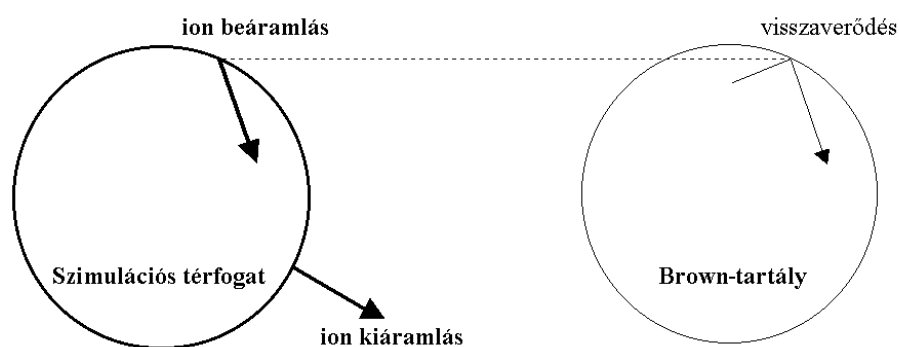
Annak érdekében, hogy a modell hűen tükrözze a valóságos fizikai rendszert, a szimulációs térfogat méretének elegendően nagyoknak kell lennie. A tapasztalatok szerint

a modell előrejelzései elegendően pontosak, ha a membrán és a szimulációs térfogat fala közötti távolság eléri a néhányszor (3-4) Debye-hossznyi értéket. Ugyanakkor, a számítási hatékonyság érdekében a térfogat méretét a lehető legkisebb, míg a szimulációs lépésközt a lehető legnagyobb értéken kell tartani. A megkívánt pontosság és a számítási hatékonyság közötti kompromisszummal definiált optimális értékek kísérletileg határozhatók meg a modellezett elektroliton végrehajtott “virtuális mérések” segítségével.

5.3 A diffúz fal

A modellben a szimulációs térfogatot virtuálisan körbeveszi a bulk elektrolitot tartalmazó végtelen komplementer tér. A szimulációs térfogat falait diffúznak (vagy nyitottnak) nevezhetjük, mivel ionok juthatnak ki, illetve be a rendszerbe. Ez alapvető követelmény, tekintve hogy a biológiai membránok tipikusan elektromosan töltött objektumok, és a szimulációs térfogatban lévő elektrolitnak képesnek kell lennie ezen töltés kompenzációjára, és így az egyensúlyi helyzet és az elektroneutralitás elérésére.

A végtelen “bulk” fázissal fennálló diffúziós kapcsolatot a “Brown-tartály” segítségével szimulálom (5.2 ábra).



5.2 ábra. A diffúzió kezelése a Brown-tartály segítségével.

A Brown-tartály minden egyes szimuláció kezdetekor létrejön a szimulációs térfogat pontos másolataként. A szimuláció során a két rendszer elektrolitjai párhuzamosan

fejlődnek, azzal a különbséggel, hogy a Brown-tartályban nincsen elektromos kölcsönhatás és a tartály falai reflexiósak. Amikor a Brown-tartályban egy ion ütközik a fallal, akkor visszaverődik, és ugyanakkor a visszavert részecske egy másolata megjelenik a szimulációs térfogat ugyanazon pontjában (befelé mutató diffúzió). Másfelől, ha egy ion elhagyja a szimulációs térfogatot, akkor az egyszerűen törlődik a szimulációs térfogat ionjainak listájáról (kifelé mutató diffúzió) (5.2 ábra). Ez az ötlet az alapja a szimulációs térfogat és az azt körülvevő végtelen "bulk" fázis közötti diffúzió modellezésének.

5.4 A szimulációs algoritmus

Az elektrolit időben egymást követő állapotait összekötő algoritmus a következő műveleteket tartalmazza, a következő sorrendben:

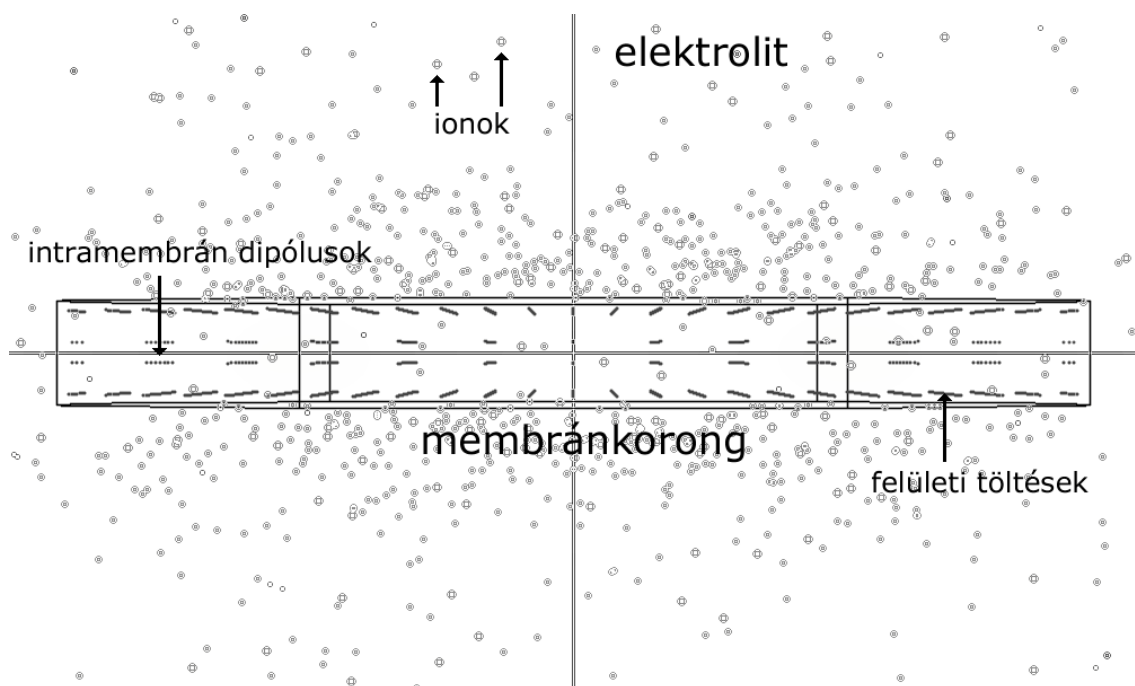
1. Az ion-ion és ion-membrán Coulomb-kölcsönhatásokból származó elmozdulások kiszámítása a rendszerben lévő összes ionra (az ionpozíciók eközben nem változnak).
2. Az ionok helyvektorainak megváltoztatása az előre kiszámított Coulomb elmozdulások (1. pont) és a Brown elmozdulások alapján.
3. Az ion-membrán ütközések kezelése.
4. A szimulációs térfogathoz kifelé mutató diffúzió kezelése.
5. A szimulációs térfogatba irányuló diffúzió kezelése a Brown-tartály segítségével.

Az ion-ion és ion-membrán Coulomb-kölcsönhatások számítása a szimulációs algoritmus időigényének döntő tényezője. Az ionrelaxáció sorra kerülő szimulációiban, nagyobb ionszám (> 1000) esetén, jó közelítéssel mondható, hogy a számítási idő az ionok számának négyzetével arányos. Rögzített koncentráció mellett, az ionok száma a szimulációs térfogat sugarának köbével arányos. Így a szimulációk időigénye a szimulációs térfogat lineáris méretének közelítőleg hatodik hatványával változik. Ez a körülmény a szimulációkat a < 1 mM koncentrációtartományba korlátozza olyan, általunk vizsgált fizikai rendszerek esetében, ahol a szimulációs térfogat méretét a benne foglalt mezoszkopikus membrán objektum szabja meg*.

*: az aktuális számítástechnikai teljesítmény mellett: AMD Athlon processzor, 1.33GHz

5.5 A szimulációs eszköz

Az 5.3 ábra a modell implementációjának kezelőfelületének egy részletét mutatja, amelyen a szimulációs térfogat közepén elhelyezkedő membránkorongot látjuk. A szimulációs térfogat alakja választhatóan gömb vagy henger. A membrán felületi töltésekkel és intramembrán dipólusokkal látható el. A felületi töltések a membránkorong két körlapjával párhuzamos síkokban fekvő egyenközű töltésháló formájában definiálhatók. A rácsállandó, a töltések értéke, a felülettől számított mélység szabadon változtatható.

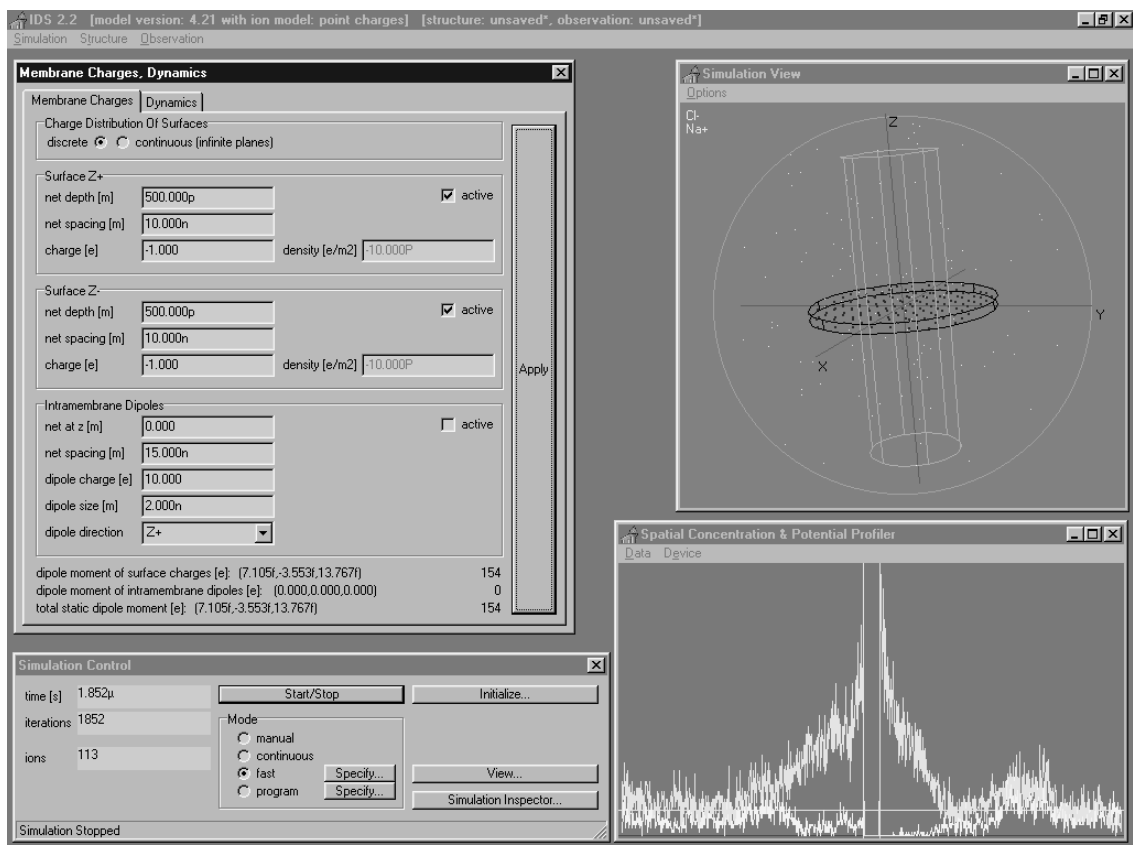


5.3 ábra. A szimulációs eszköz képernyőábrájának részlete. (A perspektivikus ábrázolás miatt az intramembrán dipólusok és felületi töltések hálóit összetartó vonalakként látjuk.)

Az intramembrán dipólusok szintén egy egyenközű töltésháló formájában adhatók meg, párhuzamosan a korong körlapjaival. A háló helyzete a membrán normálisának irányában eltolható, a rácsállandó, a rácspontokban található dipólusok paraméterei - a töltéspár távolsága, a töltés nagysága, a dipólus iránya ($x+, x-, y+, y-, z+, z-$) - szabadon beállítható. A szimulációs térfogat, a membrán geometriai paraméterei és az elektrolit

összetétele a szimuláció előtt definiálandó. Ettől eltérően a membrán felületi töltései, intramembrán dipólusai, a szimuláció dinamikai paraméterei (hőmérséklet, kölcsönhatás kapcsolók, időfeloldás, stb.) a szimuláció közben bármikor megváltoztathatók. Ez lehetőséget teremt az elektrolit dinamikai viselkedésének tanulmányozására, mint amilyen például a membránokban lejátszódó ugrásszerű töltésátrendeződések hatására lezajló ionrelaxáció.

A modellrendszer grafikus megjelenítésére a szimulációs eszköz háromdimenziós nézetet generál, amelynek segítségével vizuálisan követhetők nyomon a rendszer komponensei és változásai. A forgatható és nagyítható háromdimenziós nézet a szimulációs térfogatot, a membrán körvonalait, a felületi töltéseket, intramembrán dipólusokat, az ionokat, valamint az egyes “virtuális mérőműszerek” térbeli elhelyezkedését mutatja (5.4a ábra).



5.4a ábra. A szimulációs eszköz működés közben.

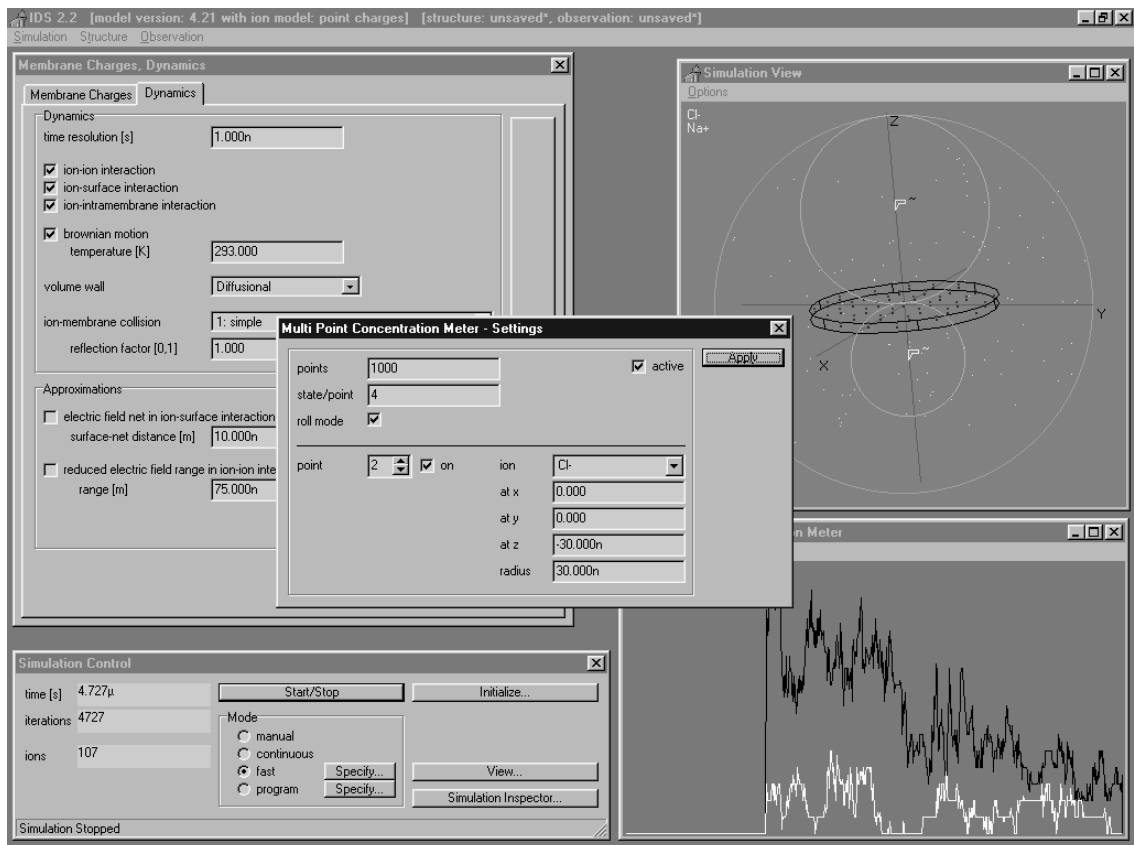
5.6 Virtuális mérőműszerek

A szimulációs eszköz virtuális mérőműszereivel mérések végezhetők a modellezett elektroliton. Az alábbiakban rövid leírását adom a már megvalósított három műszernek:

1. Dipólusmomentum mérő: Ez a műszer az elektrolit dipólusmomentumának időfüggését veszi fel a szimulációs térfogat középpontja körüli tetszőleges sugarú gömbben. (További paraméterei: az átlagolt elektrolit állapotok száma, a mérési pontok száma, opcionális “roll mód”.)
2. Többpontos koncentráció-időfüggés mérő: A műszer segítségével a szimulációs térfogat tetszőleges pontjaiban elhelyezett mérőgömbökben vehetők fel az egyes ionfajták koncentrációinak időfüggései (5.4b ábra). (A mérőgömbök sugara szabadon választható, további paraméterek: lásd az előző műszert).
3. Térbeli koncentráció- és potenciálrögzítő: Ezzel a műszerrel az ionkoncentrációnak és/vagy az elektromos potenciálnak a sugárirányban vagy a membrán normálisának irányában (z) vett függése vizsgálható (5.4a ábra). A műszer választhatóan “pillanatfelvételt” készít vagy időbeli átlagolást végez. Z -függés mérése esetén az adatok gyűjtése egy, a z tengellyel koaxiális hengerben történik. (A henger sugara, magassága, a z tengely menténi eltolása, a térbeli felbontás szabadon definiálható.)

Amennyiben arra szükség van, a szimulációs eszközhöz további virtuális mérőműszerek adhatók, például részecske-nyomkövetés, ionfluxus-mérés, felületi elektromos potenciál szkennelés céljából.

Az elektrolit dinamikai vizsgálata során, az egy szimulációból nyert fizikai mennyiségek (pl. az elektrolit teljes dipólusmomentuma) időfüggvényei tipikusan a szisztematikus változásokat jóval meghaladó szintű fluktuációkkal terheltek. A fluktuációk megfelelő szintre csökkentésének érdekében számos (100-1000), azonos paraméterkészlettel rendelkező szimuláció egymást követő futtatására van szükség. A szimulációs eszköz támogatja ezt a mérési módot: a program automatikusan inicializálja, futtatja, tárolja és átlagolja a szimulációkat. Ezen mérési sorozatok időigénye általában a néhány órától a néhány napig terjed.



5.4b ábra. A szimulációs eszköz működés közben II.

6. IONRELAXÁCIÓ - SZIMULÁCIÓK

6.1 Ellenőrzés a Debye-Hückel elmélet alapján

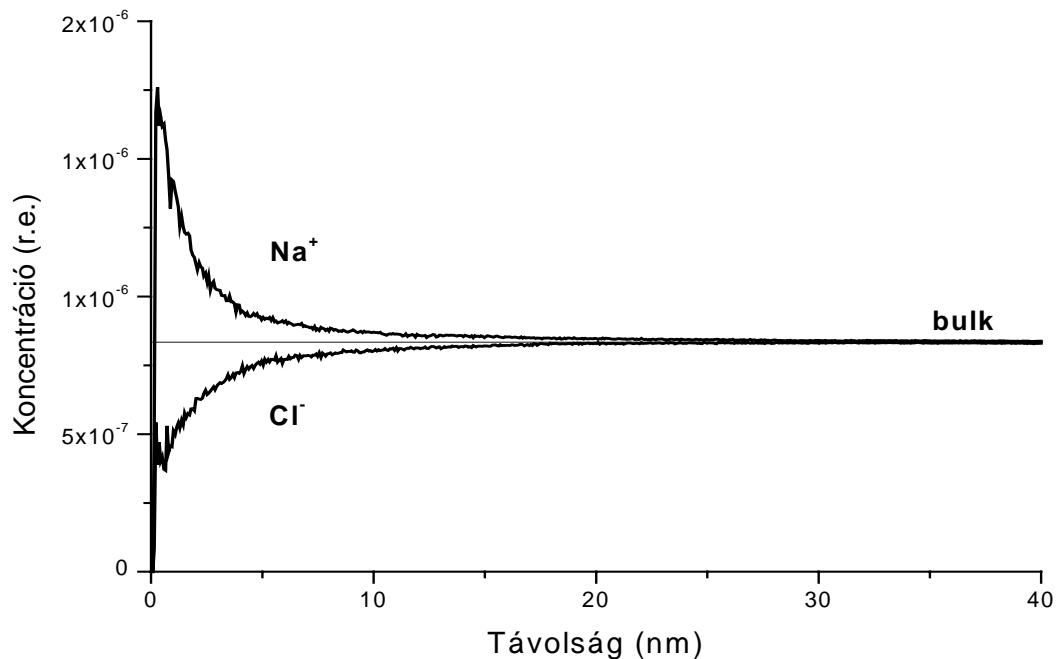
A Debye-Hückel elmélettel (Debye és Hückel, 1923) való összehasonlítás lehetőséget nyújt a létrehozott modell és implementáció megbízhatóságának ellenőrzésére. A modellezett elektroliton végrehajtott első virtuális mérések az elektrolit ismert egyensúlyi tulajdonságainak származtatása céljából történtek. A mérésekben egy szimmetrikus, Na^+ és Cl^- ionokat tartalmazó elektrolit egyensúlyi ioneloszlását határoztam meg egy rögzített ion környezetében. A modell és a folytonos elmélet összehasonlítását olyan fizikai paraméterek mellett végeztem el, amelyeket később az ionrelaxáció szimulációjánál is használtam.

A Debye-Hückel elmélet (1. fejezet 1.5 pontja) megadja egy ze töltésű, rögzített ion körül kialakuló (időátlagolt) elektrosztatikus potenciált ((1.3) összefüggés). A potenciál és az egyes ionfajták koncentrációeloszlása között az (1.5) Boltzmann-reláció teremt kapcsolatot.

Az elektrolit Na^+ és Cl^- ionjainak egyensúlyi koncentrációeloszlását meghatároztam a modellrendszerben (6.1 ábra). Az (1.5) Boltzmann-reláció alapján származtattam az elektrosztatikus potenciált, az (1.3) egyenletet használva pedig exponenciális illesztéssel meghatároztam a potenciálfüggvényhez tartozó Debye-hosszt. Az elektrolit bulk koncentrációjának értéke 0.3 mM/l volt, a szimulációs térfogat sugara (72 nm) pedig négyszerese volt a Debye-Hückel elmélet alapján számolható Debye-hossznak. A szimulációkat 250 ps, 400 ps, 1 ns és 2 ns időfeloldással hajtottam végre, 298 K abszolút hőmérsékleten, a 6.1 ábra a 250 ps időfeloldáshoz tartozik. A 250 ps, 400 ps és 1 ns időfeloldással végrehajtott szimulációkból nyert Debye-hossz kvantitatív egyezést mutatott az elméletileg várt értékkel. A modelltől számított és az elméletből adódó értékek arányai rendre 1.039, 1.061 és 0.988 voltak.

Fontos hangsúlyozni, hogy az elektrolit Debye-hossz által jellemezhető árnyékoló hatása valójában dinamikus effektus: az ionok közötti dinamikus elektromos kölcsönhatások eredményeként alakul ki. Ezért a tapasztalt kvantitatív egyezés azt jelenti, hogy a modell megbízható eredményeket ad a 250 ps – 1 ns időfeloldás-

tartomány (és hasonló fizikai paraméterekkel rendelkező rendszer) esetén. (1 ns időfeloldás felett az egyezés drasztikusan romlik, a rendszerben működő Coulomb-erők pontatlan integrálásának folyományaként.) A sikeres összehasonlítás után a szimulációs rendszert a komplikáltabb, időfüggő ionrelaxáció tanulmányozására használtam föl.



6.1 ábra. Ioneloszlás egy rögzített Cl^- ion körül a modellezett elektrolitban.

6.2 Ionrelaxációs folyamatok sebessége

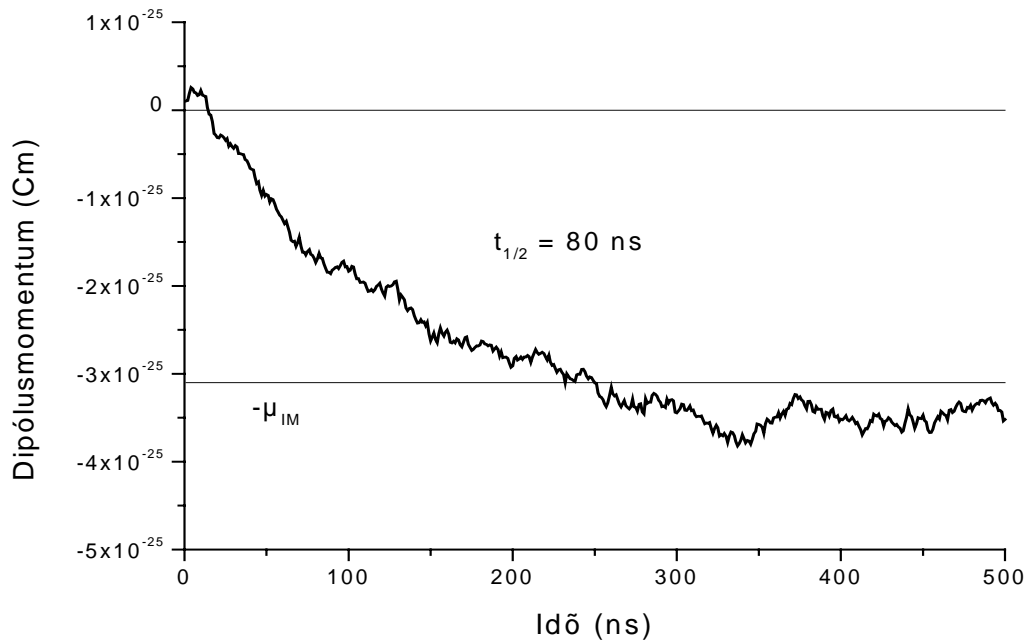
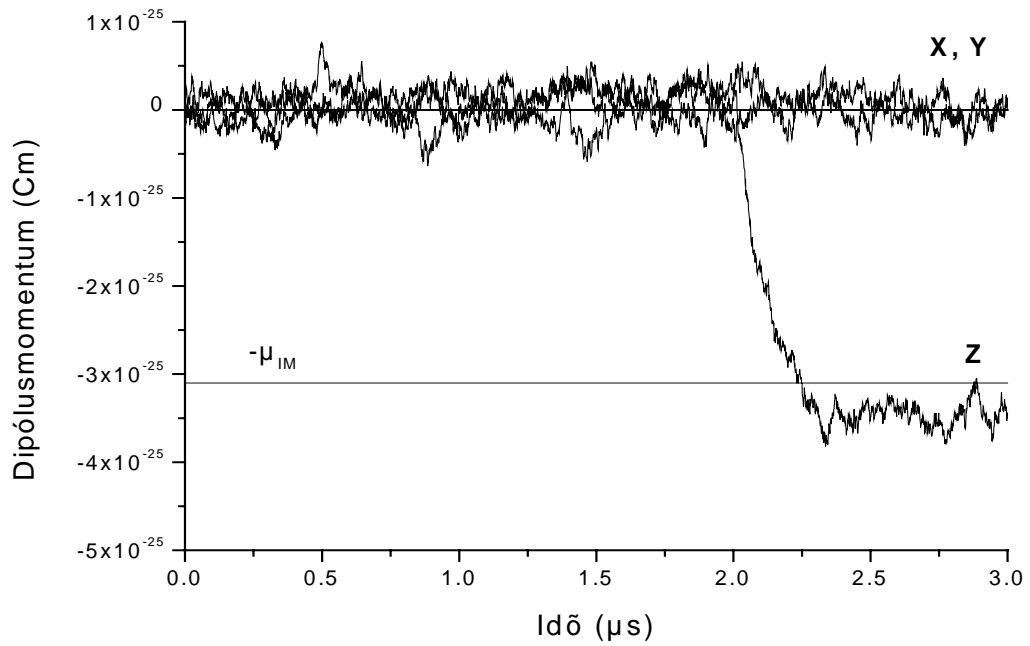
Általában, a biológiai membránok körül lejátszódó ionrelaxáció érdeklődésre tart számot (pl. Heberle és mt., 1984). Speciálisan, a membránfragmentumokban lejátszódó ugrásszerű töltésátrendeződéseket követő relaxációs folyamatok kinetikájának ismerete a szuszpenziós módszerrel nyerhető elektromos mérések egzakt kiértékeléséhez szükséges.

A bakteriorodopszin tartalmazó bíbormembránokban lejátszódó töltésátrendeződéseket követő ionrelaxációs folyamatok időállandójára adható egy felső becslés. Kísérleti adatokra alapozva ugyanis megmutatható (Keszthelyi és Ormos, 1989), hogy ezen folyamatok időtartamának kevesebbnek kell lennie egy

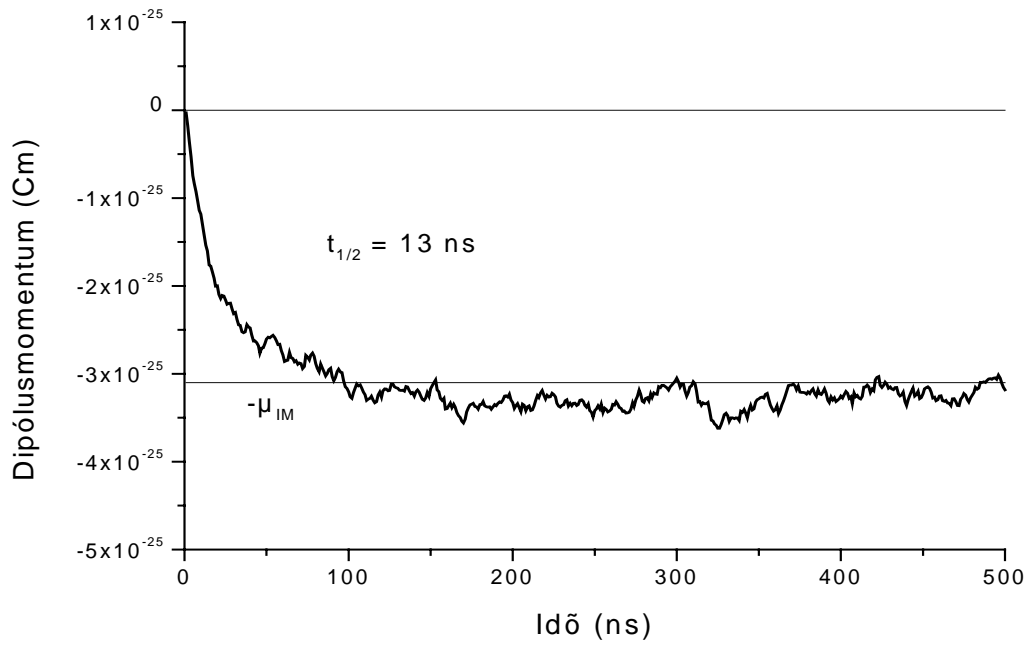
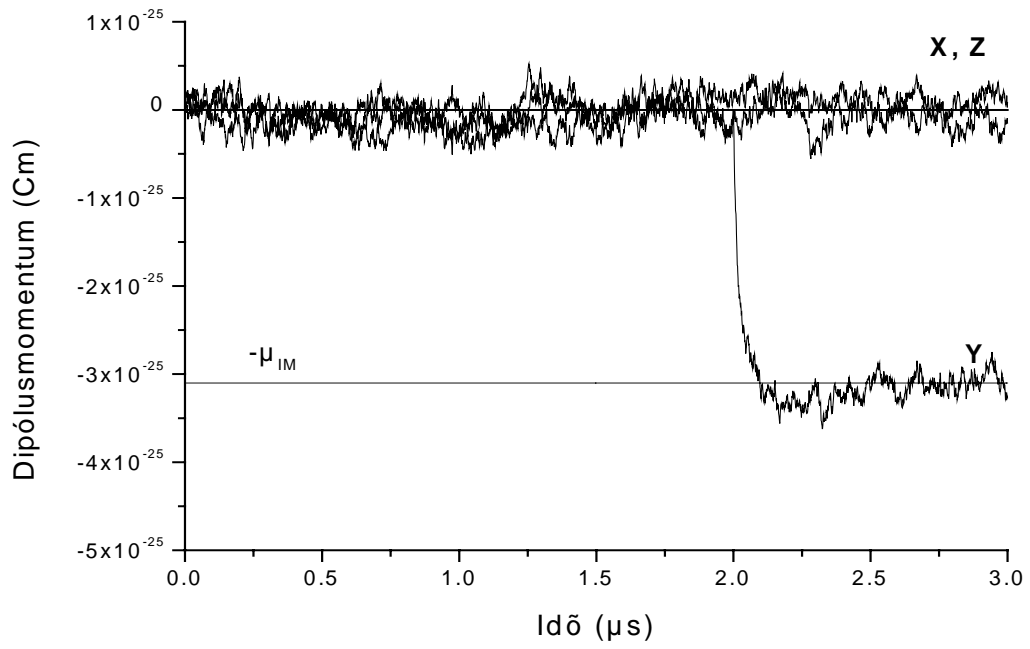
mikroszekundumnál, amennyiben az elektrolit koncentrációja meghaladja a 0.1 mM/l értéket. Mint hamarosan látni fogjuk, a szimulációk összhangban állnak ezzel a becsléssel.

A 6.2a és 6.2b ábrák az elektrolit teljes dipólusmomentumának időfüggését mutatják egy hirtelen intramembrán dipólusmomentum-változást követően. Két esetet vizsgáltam: a 6.2a ábrán látható az elektrolit válasza a membrán normálisának irányába (z tengely) eső dipólusmomentum-változás esetén, míg a 6.2b ábra a membrán síkjába (y tengely) eső dipólusmomentum-változáshoz tartozó esetet mutatja. Az ionrelaxációs kinetikát a szimulációs eszköz "dipólusmomentum mérő" műszerével rögzítettem.

A modellrendszerben a 150 nm átmérőjű szimulációs térfogatban lévő elektrolit egy 5 nm vastagságú és 50 nm átmérőjű membránkorongot vesz körül. A Na⁺ és Cl⁻ ionokat tartalmazó szimmetrikus elektrolit bulk koncentrációja 0.3 mM/l volt (a Debye-hossz itt kb. 18 nm). A membránkorong alsó és felső körlapjához tartozó felületi töltéssűrűségeket a fiziológiás tartományban választottam meg, nevezetesen a -0.04 C/m² értéket használtam. A felületi töltéseket két homogén, diszkrét töltésháló formájában definiáltam. (A töltéshálókon belül az egyes 4 e töltések között 4 nm volt a távolság, az egyenként 121 ponttöltést tartalmazó hálók membránfelülettől való távolsága pedig 500 pm volt). Hasonlóan, az intramembrán dipólusmomentumot is homogén, diszkrét háló formájában valósítottam meg, amelyet a membrán közepén helyeztem el, a felületi töltéshálóktól egyenlő távolságra. A dipólusháló rácsállandója és az egyes ponttöltések nagysága megegyezett a felületi töltéshálóknál ismertetett értékekkel, egy adott dipólus pozitív és negatív töltései között 4 nm volt a távolság. Az intramembrán dipólusmomentum teljes nagysága $\mu_{IM}=3.102 \cdot 10^{-25}$ Cm volt. A szimulációkat 250 ps időfeloldás mellett végeztem, 298 K hőmérsékleten.

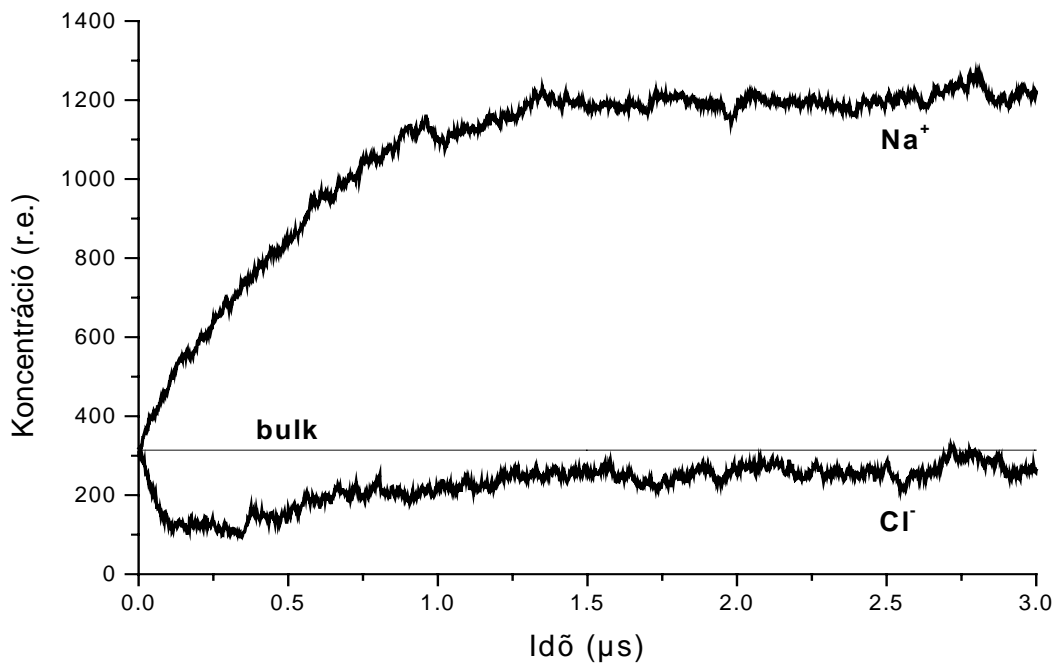


6.2a ábra. Ionrelaxáció z irányú intramembrán dipólusmomentum-változás hatására (alul a 2-2.5 μs tartomány látható nagyítva).



6.2b ábra. Ionrelaxáció y irányú intramembrán dipólusmomentum-változás hatására (alul a 2-2.5 μs tartomány látható nagyítva).

A szimulációk által felölelt teljes idő 3 μs volt, amelyből 2 μs -ot vett igénybe a rendszer egyensúlyi helyzetének beállása, azaz a membrán körüli diffúz kettősréteg kialakulása a kezdeti véletlenszerű ioneloszlásból indulva. A diffúz kettősréteg ezen felépülési folyamatát egy további virtuális mérőműszerrel követtem nyomon, amely a szimulációs térfogatban lévő Na^+ és Cl^- ionok számát mérte az idő függvényében (6.3 ábra).



6.3 ábra. A diffúz kettősréteg felépülése.

A folyamat során a Cl^- ionok száma csökkent, a Na^+ ionok száma pedig az ellentétes töltésű ionok csökkenését jelentősen meghaladó mértékben nőtt, összhangban a rendszer elektromos semlegességének követelményével. (Az ionok teljes száma a kezdeti 634 értékről 1500 fölé emelkedett.)

Az intramembrán dipólust 2 μs -nál kapcsoltam be. Az elektrolit dipólusmomentumának fluktuációi egyetlen szimulációban jóval nagyobbak, mint az intramembrán dipólusmomentum-változás által okozott hatás. A fluktuációk elfogadható szintre való csökkentésének érdekében, a szimulációs eszköz 100, azonos paraméterkészlettel rendelkező szimulációt hajtott végre és átlagolt.

Az ábrákon feltüntetett felezési időket multiexponenciális simitás után határoztam meg.

Amint látható, az y irányú dipólusmomentum-változáshoz tartozó relaxációs folyamat szignifikánsan gyorsabb, mint a z irány esetében. Annak megvizsgálásához, hogy az anizotrópia kialakulásában mekkora szerepe van magának a membrán geometriának, illetve a diffúz kettősrétegnek, további szimulációkat hajtottam végre. Ezekben a mérésekben a membrán nem tartalmazott felületi töltéseket, tehát így a diffúz kettősréteg sem volt jelen. Ahogy azt majd a későbbiekben megmutatom, a relaxációs kinetika itt is mutat anizotrópiát, de az irányfüggés kevésbé hangsúlyozott.

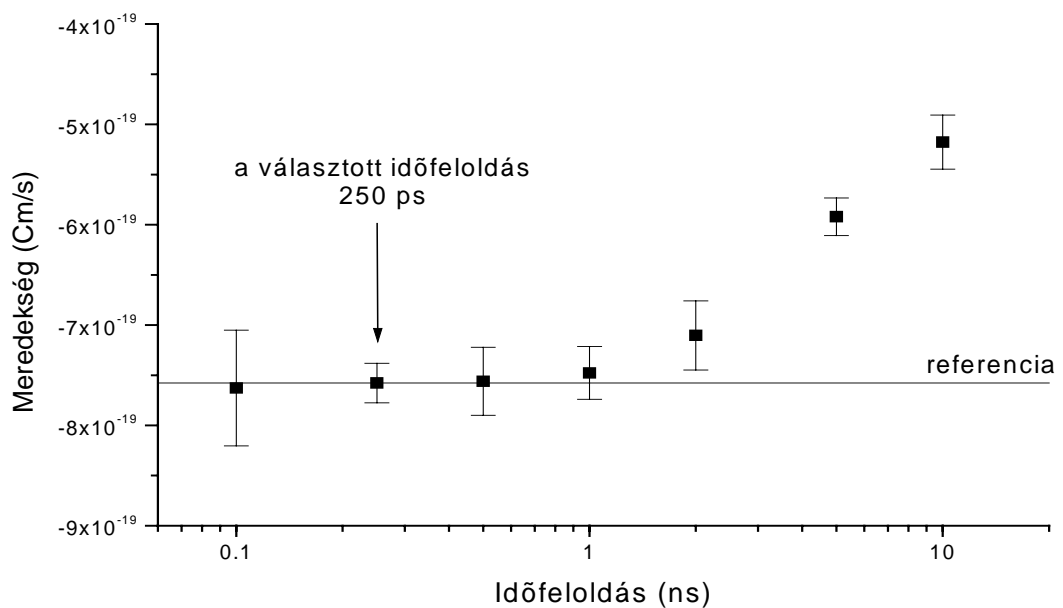
A következőkben egyrészt (a) kontrollszimulációkat mutatok be az alkalmazott időfeloldás és a szimulációs térfogat megfelelő nagyságának közvetlen ellenőrzése céljából, másrészt (b) a relaxáció kinetikájának az intramembrán dipólusháló geometriai részleteitől való függését, (c) az elektrolit válaszának linearitását, (d) az ionrelaxáció anizotrópiáját vizsgálom. Az egyszerűség kedvéért, és teljesítménymegfontolások alapján a relaxációs kinetika kezdeti lineáris szakaszát használom föl a folyamatok sebességének jellemzésére, és a mérések a felületi töltésektől mentes membránkorong esetéhez tartoznak.

6.3 Kontrollszimulációk

Vannak olyan szimulációs paraméterek, amelyeket empirikus és praktikus megfontolások alapján kell megválasztani. Esetünkben ilyen paraméterek a szimulációs időfeloldás és a szimulációs térfogat nagysága. Finomabb időfeloldás vagy nagyobb szimulációs térfogat használata növeli a szimulációk pontosságát, ezzel együtt azonban hosszabb számolási időt jelent. Az optimális érték tehát kompromisszum, amelyet a kívánt pontosság és az adott feladatra fordítható idő határoz meg.

Az időfeloldás felső korlátja abból adódik, hogy az ion-ion és ion-membrán elektromos kölcsönhatásokat megfelelő pontossággal kell integrálni. Az optimális érték közvetlenül meghatározható úgy, hogy különféle időfeloldások mellett szimulációkat végzünk, és összehasonlítjuk az adódó relaxációs kinetikákat. A relaxációs folyamat első 100 ns-a lineárisnak tekinthető (lásd a 6.5 ábrát, A eset). Így a relaxációs kinetika különböző időfeloldásoknál, lineáris illesztés után kapott kezdeti meredekségei

közvetlen összehasonlítást tesznek lehetővé. A 6.4 ábra a relaxáció kezdeti meredekségeit mutatja a 100 ps - 10 ns időfeloldás-tartományban. Mindegyik időfeloldáshoz 5 független mérés tartozik, amelyek egyenként 4000 szimuláció átlagából származnak (kivétel a 100 ps időfeloldás esete, ahol a számítási idő csökkentése érdekében 2000 szimuláció átlagát vettem). Az ábrán látható referencia vonalat a 250 ps időfeloldáshoz tartozó meredekségek átlaga definiálja. Az értékek mellett feltüntettem a standard deviációkat is.



6.4 ábra. Az időfeloldás kontrollszimulációi.

Amint látható a meredekségek 1 ns-nál kezdenek távolodni a referencia vonaltól, összhangban a korábban vázolt összehasonlító méréssel, ahol a Debye-Hückel elmélettel való egyezést vizsgáltam. A < 1 ns tartományban a meredekségek közel azonosak, így a szimulációkban alkalmazott 250 ps időfeloldás ésszerű értéknek mondható.

Megjegyzem, hogy a 250 ps szimulációs lépésköz “durvának” nevezhető más, Brown-dinamikai módszereket alkalmazó munkákban található értékekhez képest. Ez két tényezővel kapcsolatos: 1. a szimulációkban alacsony koncentrációtartományban dolgozunk, 2. az ionrelaxációs folyamatok mezoszkopikus térfogatokban játszódnak le. Mindebből következik, hogy az ionok elmozdulásai egy szimulációs lépés során

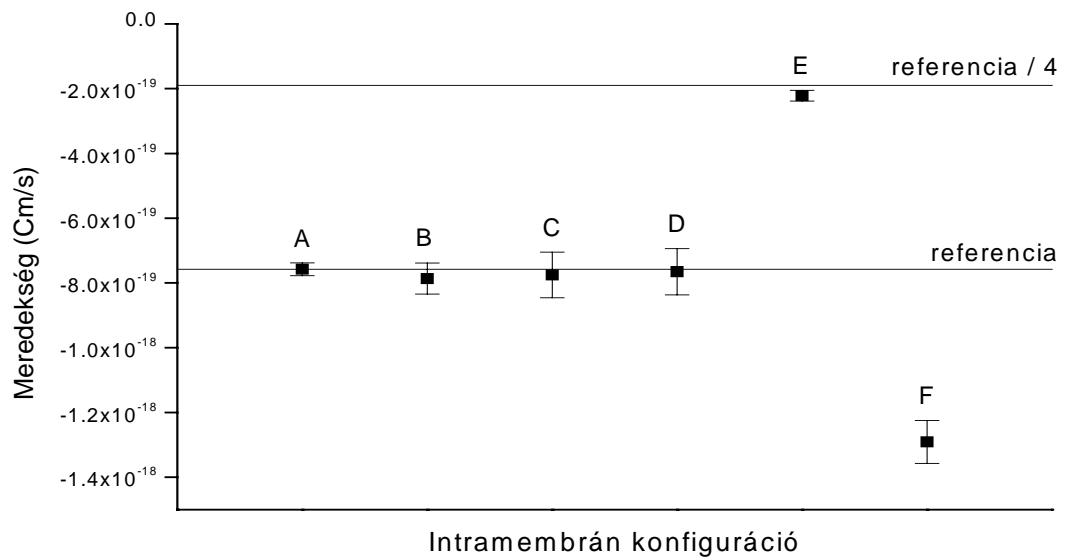
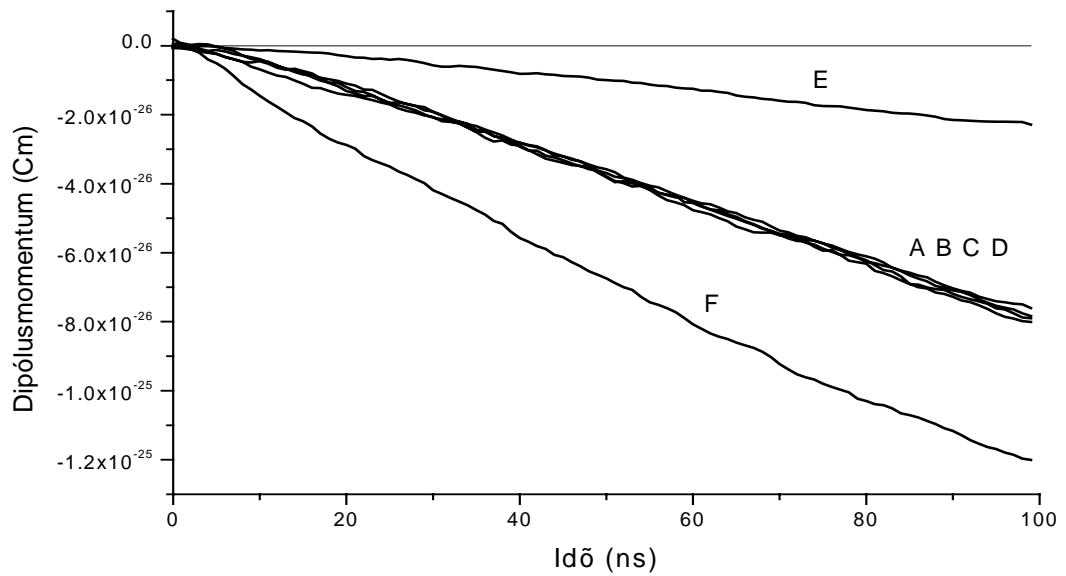
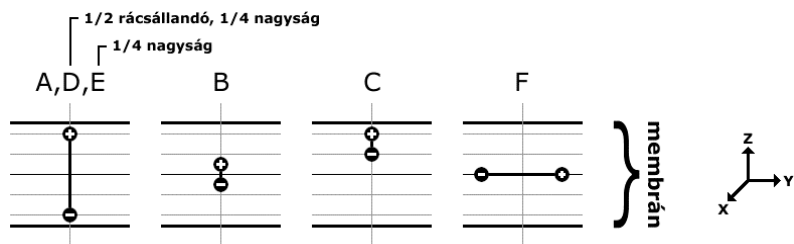
elegendően kicsik a tipikus ion-ion és ion-membrán távolságokhoz képest, így az elektromos kölcsönhatások számítása kielégítő pontossággal történik.

A szimulációs lépésközhöz hasonlóan a szimulációs térfogat megfelelő nagyságát is ellenőriztem. Három független, egyenként 2000 szimulációból álló mérési sorozatot hajtottam végre 200 nm térfogatátmérő mellett. Ez több mint kétszeres szimulációs térfogatnak felel meg az eredeti rendszerrel (150 nm átmérő) összehasonlítva. A megnövelt térfogatú kontrollrendszerben kapott relaxációs kinetika szintén hibán belüli egyezést mutatott a referencia rendszerrel.

6.4 Az intramembrán dipólus-konfiguráció szerepe

Az eddigiekben az intramembrán dipólusmomentumot egy, a membrán közepén elhelyezett háló formájában valósítottam meg. Az ionrelaxáció szimulációját egy adott dipólusháló-geometria (rácsállandó, háló mélység, dipólkar-hossz) mellett végeztem. Joggal tehető fel a kérdés, hogy az intramembrán dipólusháló konkrét geometriai részletei befolyásolják-e az ionrelaxáció kinetikáját, és ha igen, hogyan? Amint azt hamarosan megmutatom, a relaxáció kinetikája nem mutat szignifikáns változást az intramembrán dipólusháló geometriai részleteinek, a molekuláris távolságok nagyságrendjébe eső változtatásakor.

A 6.5 ábra az intramembrán konfiguráció (dipólusháló-geometria) hat különböző esetéhez (A,B,C,D,E és F) tartozó ionrelaxáció kezdeti szakaszát mutatja. Az A,B,C,D,E esetekben az intramembrán dipólusok párhuzamosak a membrán normálisával (z tengely), az F esetben merőlegesek rá (y tengely). Az E eset kivételével az egyes konfigurációkban azonos a teljes intramembrán dipólusmomentum, de mindegyik esethez más hálógeometria tartozik. Az A eset felel meg az eddigi szimulációk során használt intramembrán dipólushálónak (referencia esetként is hivatkozom rá később): a háló a membrán közepén helyezkedik el, a rácsállandó 4 nm, a töltések nagysága 4 e, az egyes dipólkarok hossza 4 nm. A B esetben a dipólkarok hosszát negyedére csökkentettem, a dipólusmomentumok nagyságának megtartása mellett ("összehúztam" a dipólusokat). A C esetben a B esethez tartozó hálót 1.5 nm-rel eltoltam a membrán normálisának irányában (a felülethez közelítettem).



6.5 ábra. Az ionrelaxáció kezdősebessége az intramembrán konfiguráció függvényében.

A D eset a referencia (A) esettől csak annyiban tér el, hogy finomítottam a dipólusháló felbontását a teljes intramembrán dipólusmomentum megtartása mellett (a rácsállandót felére, az egyes dipólusmomentumok nagyságát negyedére csökkentettem). Mindegyik intramembrán konfiguráció esetén 5 független mérésből határoztam meg az ionrelaxáció kezdeti meredekségét. A mérések egyenként 2000 szimuláció átlagán alapulnak (kivéve az E esetet, ahol a megfelelő jel-zaj viszony elérése érdekében 16000 szimuláció átlagával számoltam). A 6.5 ábra felső részén az 5 szimulációs széria átlagából nyert kinetika látható konfigurációnként. A ábrán látható referencia vonalat az A esetben mért meredekségek átlaga definiálja. Az ábrán feltüntettem az egyes meredekségek standard deviációját is.

Látható, hogy a relaxáció kinetikája érzéketlen az A,B,C és D intramembrán konfigurációk közötti különbségre. Ez szintén a rendszer mezoszkopikus méreteivel magyarázható: a relaxációban résztvevő ionok a membrán körüli, viszonylag nagy térfogatban helyezkednek el. Az ionok és a membrán közötti tipikus távolságok nagyok az egyes intramembrán konfigurációk közötti szerkezeti különbségekhez képest.

Amint azt további vizsgálatok alapján megállapítottam, a felületi töltésháló geometriai részleteinek (molekuláris mérettartományban értelmezett) változtatásai sem befolyásolják mérhető módon az ionrelaxáció kinetikáját, az intramembrán dipólusháló esetében tapasztaltakhoz hasonlóan.

6.5 A dipólusugrásra adott válasz linearitása

Megvizsgáltam, hogyan függ a relaxációs kinetika az intramembrán dipólusmomentum nagyságától. A 6.5 ábrán látható E esethez tartozó dipólusháló az A referencia eset dipólushálójától csak annyiban különbözik, hogy a dipólustöltések nagyságát negyedére csökkentettem. Így a laterális dipólusmomentum-sűrűség (és a teljes intramembrán dipólusmomentum) is negyede az eredeti értéknek. Az eredmények azt mutatják, hogy az elektrolit válasza egy adott μ_{IM} intramembrán dipólusmomentum-változásra jó közelítéssel lineáris abban az értelemben, hogy az elektrolit $\mu(t)$ dipólusmomentum-függvényére felírhatjuk:

$$\mu'_{IM} = \alpha \cdot \mu_{IM} \Rightarrow \mu'(t) = \alpha \cdot \mu(t) \quad (6.1)$$

A dipólusmomentum itt vizsgált linearitási tartománya tartalmazza a szuszpenziós módszer tipikus kísérleti körülményeit. (Az egyszerű elképzelhetőség kedvéért megjegyzem, hogy az A eset dipólushálója átranzformálható egy olyan (azonos dipólusmomentummal rendelkező) hálóba, ahol az egyes dipólusok pozitív és negatív töltései 1 nm-re vannak egymástól, és a szomszédos dipólusok közötti távolság szintén 1 nm.)

6.6 Az ionrelaxáció anizotrópiája

Az F esetben (6.5 ábra) a teljes intramembrán dipólusmomentum és a dipólusok laterális sűrűsége ugyanaz, mint az A esetben, de az egyes dipólusok iránya merőleges a membrán normálisára (azaz a dipólusháló rácspontjaiban az A esethez képest 90° -kal elforgatott dipólusok ülnek). Amint az ábráról leolvasható, az ionrelaxáció szignifikánsan gyorsabb ebben az irányban (y). A két irányhoz (y és z) tartozó sebességek aránya hozzávetőlegesen 1.67 az ionrelaxáció kezdeti lineáris szakaszában. Ez az arány természetesen függ a membránkorong sugarától (a membrán méretének csökkenésével a kinetikai anizotrópiának el kell tűnnie). Ahogy azt már korábban bemutattam, a diffúz kettősréteg jelenlétében az anizotrópia jelentősen nagyobb mértékű (az y és z irányú dipólusokhoz tartozó ionrelaxációs sebességek aránya megközelítőleg 5, lásd a 6.2a és 6.2b ábrákat).

Összegzésképpen elmondható, hogy az ionrelaxáció kinetikai értelemben már “bulk” elektrolit (homogén ioneloszlás) esetén is anizotróp, amely anizotrópia jelentősen fokozódik, ha a diffúz kettősréteg is jelen van a membrán körül.

6.7 Diszkusszió

Amint arról már korábban szó esett, a szuszpenziós módszer lehetővé teszi, hogy membránfehérjék töltésátrendeződéseit három dimenzióban kövessük nyomon. A szuszpenziós módszerrel kapott kísérleti adatok kvantitatív értelmezése a korábban vázolt elmélet alapján lehetséges, amennyiben a mintában lévő membránfragmentumok

körül lejátszódó ionrelaxációs folyamatokra nézve néhány feltételezéssel élünk. Az ionrelaxációs szimulációkból nyert tulajdonságok éppen ezeket a feltételezéseket támasztják alá.

A szimulációk alapján meghatároztam az ionrelaxáció felezési idejét diszkrét intramembrán dipólusháló esetében. Mivel a relaxációs kinetika nem változott a háló felbontásának finomításával (6.5 ábra D esete), ezért mondhatjuk azt, hogy a szimulációkban használt diszkrét háló jól közelíti a folytonos és homogén dipóluseloszlás idealizált esetét (a továbbiakban ezt a “folytonos korong” esetének hívom).

Ezzel ellentétben, a szuszpenziós módszer tipikus kísérleti körülményei között, a konformációs változások (és így az ezekkel járó dipólusmomentum-ugrások) egy kiszemelt membrándarabkán ritka eseménynek számítanak az ionrelaxációs folyamatok időskáláján. Így ebben az esetben lokális dipólusmomentum-változásokkal van dolgunk.

Meg lehet mutatni, hogy a szimulációkból nyert tulajdonságok (adott sebesség, anizotropia, linearitás, intramembrán részletekre való érzéketlenség) kiterjeszthetők a szuszpenziós módszer kísérleti körülményei között fennálló mintabeli viszonyokra is.

Ennek belátásához először az általánosság megszorítása nélkül tegyük föl, hogy a minta elektrolitjában szuszpendált membrándarabkák alakja korong. Válasszunk ki gondolatban egy adott korongméretet és síkot. Vegyük azon korongokat, amelyek (a korongok méreteloszlásához képest, közelítőleg) a kiválasztott mérettel rendelkeznek és a kiválasztott síkban fekszenek. A korongok ezen részrendszerére, szuperpozíciós megfontolások alapján belátható a következő: a folytonos korong esetére érvényes ionrelaxációs sebesség (az adott sugár esetén) megegyezik nagyszámú - véletlenszerűen kiválasztott korong véletlenszerű helyein végbemenő - lokális dipólusmomentum-változást kísérő ionrelaxációs folyamat átlagsebességével. Természetesen ez a megállapítás a valóságos mintákban található bármely korongméretre és síkra érvényes, így az ionrelaxációnak a szimulációkban vizsgált tulajdonságai kiterjeszthetők erre az összetettebb esetre is. A szuperpozíciós elv alkalmazásának feltétele, hogy a membránokat körülvevő ionfelhőket az intramembrán dipólusmomentum-változások hatása csak elhanyagolható mértékben perturbálja. Ez a feltétel teljesül a valóságos minta membránjai esetében és a szimulációk során vizsgált ionrelaxáció kezdeti szakaszában is. Ezek alapján tehát joggal mondhatjuk, hogy az ionrelaxáció kezdeti szakaszának tanulmányozásával nyert kinetikai tulajdonságok (sebesség, anizotropia, linearitás, intramembrán részletekre való érzéketlenség) átvihetők a lokális

dipólusmomentum-változásokat mutató valóságos mintákban lejátszódó ionrelaxációs folyamatok teljes időtartamára is.

A szimulációk alapján az ionrelaxációs folyamatok sebességére nyert információt felhasználva már vizsgálható a szuszpenziós módszer elméletében kiindulási feltételként felírt (3.1) reláció teljesülése. A reláció szerint az ionrelaxációs folyamatoknak jelentősen rövidebb idő alatt kell lejátszódnuk, mint a vizsgált intermedierek élettartamai. A szimulációkból származó néhányszor 10 ns-os értékek becslésként használhatók a relaxációs folyamatok felezési idejére hasonló ionkoncentrációk esetén, és felső becslésként alkalmazhatók a nagyobb koncentrációk tartományában, ahol az ionrelaxáció lefutása gyorsabb.

Az ionrelaxáció érzéketlensége az intramembrán dipólusháló vizsgált geometriai változtatásaira, molekuláris nyelvre lefordítva azt jelenti, hogy az ionrelaxációs folyamat nem függ az intramolekuláris töltésátrendeződés konkrét részleteitől, csak az átmenethez tartozó dipólusmomentum-vektortól.

Az ionrelaxáció (6.1) linearitása és az intramembrán dipólusháló részleteire való érzéketlenség azért különösen fontos, mert csak ekkor teljesül a szuszpenziós módszer elméletének alapvető (3.4) összefüggése, amely kvantitatív kapcsolatot létesít az intermedierek dipólusmomentumai és a makroszkopikusan detektálható dipólusmomentum-időfüggvény között.

A szimulációk alapján kimutatott kinetikai anizotrópia fontos következménye, hogy a (3.4) összefüggéssel számítható intermedier dipólusmomentumoknak a membrán síkjában lévő és az arra merőleges komponensei nem mérhetők össze egymással, csak egy, a két esetben eltérő (a mintára jellemző), ismeretlen szorzófaktor erejéig határozottak. Az eltérő szorzófaktor a nem ekvivalens irányokban eltérő sebességgel lejátszódó ionrelaxációs folyamatok következménye.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során megalapoztam a szuszpenziós módszer elméleti háttérét: megadtam a makroszkopikusan mérhető (foto) feszültség és az azt létrehozó molekuláris töltésmozgások közötti fizikai kapcsolat kvantitatív elméleti leírását.

A leírásban tárgyaltam az egyes orientálási/rendezési módszerekhez tartozó mintaanizotrópiák eseteit, a fotoszelekció alkalmazási lehetőségeit.

Létrehoztam egy, a háromdimenziós szuszpenziós módszerrel történő mérések tervezését, értelmezését segítő számítógépes programot.

A program alapján definiáltam egy mérési eljárást, amellyel beállítható a minta rotációs helyzete, azaz a minta orientációs/rendezési tengelye a mérőelektrodák által kijelölt irányba hozható. A minta rotációs pozicionálásának ezen módszere magát a (foto)elektromos feszültségjeleket használja fel, így kivitelezése praktikus.

Megadtam egy mérési eljárást a $\mu^y(t)$ komponens meghatározására nem tökéletesen orientált minták esetében. Az eljárás tekintetbe veszi azt a körülményt, hogy a megfelelő laboratóriumi irányban a $\mu^y(t)$ komponens mellett jelen van a mérést zavaró $\mu^z(t)$ komponens is.

Közreműködtem a bakteriorodopszin mintákon végzett fotoelektromos mérések tervezésében és kivitelezésében, a kísérleti eredmények kiértékelésében, és azoknak molekuladinamikai modellekkel történő összevetésében.

A bakteriorodopszin esetében demonstráltam a szuszpenziós módszer alkalmazását molekuladinamikai modellek érvényességének ellenőrzésére. Bemutattam, hogy fotoelektromos és abszorpciókinetikai mérések kombinálásával hogyan nyerhető kvantitatív információ az egyes intermedierek dipólusmomentumaira vonatkozóan. Ez az információ módot ad az egyes intermedier térszerkezetek ellenőrzésére, ami alapján közvetlenül tesztelhető az adott molekuladinamikai modell.

Megadtam a fotoelektromos mérésekből nyerhető, és két molekuladinamikai modell által adott térszerkezetekből számítható dipólusmomentumok értékeit a fotociklus 0 – 400 μ s időtartományában megfigyelhető K, L, M intermedierek esetében. Noha egyik molekuladinamikai leírás sem tekinthető teljesen kielégítőnek, figyelemre

méltó korreláció állapítható meg az egyik modell esetében a kísérleti és elméleti úton kapott értékek között. Az értekezésben részletezett mérési és kiértékelési eljárás felhasználható lesz a jövőben megjelenő, továbbfejlesztett molekuladinamikai modellek ellenőrzésére is, és pozitív összehasonlító eredmény esetén az adott modell kiválasztására.

A szuszpenziós módszer elméleti leírása támaszkodik néhány feltételezésre, amelyek az intramembrán töltésátrendeződéseket kísérő ionrelaxációs folyamatok kinetikai tulajdonságaira vonatkoznak. Ezen fizikai problémakör tárgyalására, tágabb értelemben az elektrolit mezoszkopikus méretskálán történő dinamikai modellezésére kidolgoztam egy módosított Brown-dinamikai modellt, és létrehoztam a modell számítógépes implementációját. A modellben az elektrolitot alkotó ionok mozgását a Langevin-egyenlet diffúziós határesetére építve számoltam. Az implementációban a modellrendszer összes fizikai paramétere módosítható: A rendszer geometriai paraméterei, az elektrolit összetétele a szimuláció előtt, a membrán elektromos tulajdonságai (felületi töltések, intramembrán dipólusok), a hőmérséklet a szimuláció során bármely időpontban megváltoztathatók. Az implementáció részeként virtuális mérőműszereket hoztam létre, amelyekkel a továbbiakban a modellezett elektroliton méréseket végeztem.

A modell, illetve az implementáció megbízhatóságát az elektrolit Debye-Hückel elméletével való összehasonlítás alapján, az ionrelaxációs szimulációknál alkalmazott fizikai paraméteregyüttes (elektrolit összetétel, hőmérséklet, szimulációs paraméterek) mellett ellenőriztem. Egy rögzített ion körüli ioneloszlást vizsgálva megállapítottam a Debye-Hückel elméletből és a szimulációkból származtatott Debye-hosszak kvantitatív egyezését.

A modell ellenőrzését követően pillanatszerű intramembrán töltésátrendeződéseket kísérő ionrelaxációs folyamatokat modelleztem. Az elektrolit válaszát membránkorongban létrehozott dipólusmomentum-változás esetén tanulmányoztam, és a következőket állapítottam meg:

Meghatároztam az ionrelaxációs folyamathoz rendelhető felezési időt a membrán síkjára merőleges és a membrán síkjába eső pillanatszerű dipólusmomentum-változás esetében, adott membrán-elektrolit konfiguráció (geometria, felületi töltések, elektrolit összetétel, hőmérséklet) mellett.

Megállapítottam, hogy a relaxációs folyamat kinetikai értelemben anizotróp: a membrán síkjába eső dipólusmomentum-változás hatására lejátszódó ionrelaxáció

gyorsabb, mint a membrán normálisának irányában keltett dipólusmomentum-változáshoz tartozó folyamat.

Megmutattam, hogy az ionrelaxáció kinetikai anizotrópiája a felületi töltésektől megfosztott membrán esetében, azaz a diffúz kettősréteg hiányában is jelen van, de az elektromosan töltött membránt körülvevő diffúz kettősréteg jelenléte szignifikánsan fokozza a kinetikai anizotrópiát.

További mérésekből megállapítottam az ionrelaxációs válasz linearitását egy olyan tartományban, amely tartalmazza a szuszpenziós módszer tipikus kísérleti körülményeit.

Kimutattam, hogy az ionrelaxáció kinetikája érzéketlen az intramembrán dipólusháló eltolásaira a molekuláris mérettartományban. Ennek fontos következménye, hogy a dipólusmomentum-változás konkrét molekuláris megvalósulása nem befolyásolja az ionrelaxációs folyamat sebességét, és így a szuszpenziós módszer elmélete szerint nem módosítja a makroszkopikus feszültségjel alakját, és ezért kvantitatív kapcsolat létesíthető a mért mennyiségek és a molekuláris dipólusmomentumok között.

Az ionrelaxáció modellezésével nyert fenti tulajdonságok együtt egy feltételrendszert képeznek, amelyre alapozva felépítettem a szuszpenziós módszer elméletét.

A kiterjedten tesztelt, eredetileg az ionrelaxáció problémakörének megoldásához kifejlesztett szimulációs rendszert önmagában is fontos eredménynek tartom, mivel a modell mezoszkopikus és korpuzkuláris természete, az implementáció rugalmassága egy olyan általánosan használható eszközt alapoz meg, amellyel a membrán-elektrolit rendszerek dinamikai jelenségeinek további nyitott kérdései is tanulmányozhatóvá válnak.

SUMMARY

In this work I established the theory of the suspension method: I gave a quantitative theoretical description of the physical connection between the macroscopically detectable (photo)voltages and the molecular charge motions generating them.

In my description I discussed the different cases of sample anisotropy corresponding to the different orienting/aligning techniques and the possibilities of using photoselection.

I created a special software to support the design and interpretation of measurements with the three-dimensional suspension method.

Based on the software, I defined an experimental technique for the exact rotational positioning of the sample (i.e. the orientation/alignment axis in the sample) relative to the measuring electrodes. Since this method uses the photoelectric voltages directly, its realization is very practical.

I described a measuring technique for the detection of the $\mu^y(t)$ component in the case of samples not perfectly oriented. This technique takes into account that on the particular axis of the laboratory coordinate system the $\mu^y(t)$ component is always contaminated by the $\mu^z(t)$ component.

I participated in the design and realization of the photoelectric measurements performed on bacteriorhodopsin, the evaluation of experimental data and their comparison with data of molecular dynamic models.

I demonstrated the application of the suspension method to verify molecular dynamic models in the case of bacteriorhodopsin. I showed how quantitative information on the intermediate dipole moments can be obtained by the combination of photoelectric and absorption kinetic measurements. This information can be used to verify intermediate structures and thus to test the corresponding molecular dynamic model. I determined the (relative) dipole moments of the intermediates present in the 0-400 μs range of the photocycle (the K, L and M intermediates) calculated from the photoelectric measurements and obtained from the structural data of two molecular dynamic models. Although none of the molecular dynamic descriptions can be stated as satisfying on the whole, there is a noteworthy correlation of the theoretical and

experimental values in case of one of the models. The measuring and evaluation procedure discussed in this work in detail will be applicable to verify improved molecular dynamic models of the future too, and in case of a positive comparative result for the selection of the particular model.

The theory of the suspension method is based on some assumptions concerning the kinetic properties of ionic relaxation processes following intramembrane charge rearrangements. To discuss this physical subject in particular, and to model the dynamics of the electrolyte on the mesoscopic scale in general, I defined a modified Brownian dynamics model and developed the corresponding software implementation. In the model, the motion of individual ions is calculated using the form of the Langevin equation valid in the diffusive regime. In the implementation all physical parameters of the model system can be modified: geometric properties of the system, the composition of the electrolyte can be defined when starting a simulation, the electric properties of the membrane (surface charges, intramembrane dipoles), the temperature can be changed at arbitrary points during the time course of simulations. As part of the implementation I created "virtual measuring devices", which were used afterwards to perform measurements on the modeled electrolyte.

I verified the solidity of the model (and implementation) by a comparison with the Debye-Hückel theory of the electrolytes at the same parameter set (electrolyte composition, temperature, simulation parameters) as used later for the dynamic investigations of ionic relaxation processes. By measuring the ionic distribution around a fixed central ion, I found a quantitative agreement of the Debye-lengths given by the theory and calculated from the simulations.

After the successful test, I simulated ionic relaxation processes following abrupt (on the time scale of the relaxation) intramembrane charge rearrangements. By modeling the response of the electrolyte to an intramembrane dipole change created in a membrane disk I derived the following:

I determined the half time of the ionic relaxation in case of an intramembrane dipole change parallel with the membrane normal and in case of a dipole change perpendicular to it (i.e. in the membrane plane) at a given biomembrane-electrolyte configuration (geometry, surface charges, electrolyte composition, temperature).

I found that the relaxation kinetics is anisotropic: the ionic relaxation generated by the intramembrane dipole change in the membrane plane is faster than it is in case of a dipole change parallel with the membrane normal.

I showed that although the kinetic anisotropy of the ionic relaxation can be observed even if there are no surface charges on the membrane disk, i.e. in the absence of the diffuse double layer, the presence of the double layer around the charged membrane significantly raises the extent of anisotropy.

Further simulations prove that the kinetics of the ionic relaxation is linear with regard to the magnitude of the intramembrane dipole change in a range that contains the measuring conditions of the suspension method.

I demonstrated that the kinetics of the ionic relaxation is insensitive to shifting the intramembrane dipole grid on a molecular distance scale. As an important implication, the concrete molecular realization of the dipole change does not affect the speed of the relaxation process, and hence, according to the theory of the suspension method, the shape of the resulting macroscopic voltage is also unaffected, which allows to establish a quantitative connection between the measured function and the molecular dipole moments.

The above properties obtained by modeling the ionic relaxation define the set of assumptions on which the theory of the suspension method has been established.

I consider the simulation system, extensively tested, originally developed to study ionic relaxation processes, as a substantial result in itself: The corpuscular and mesoscopic nature of the model and the flexibility of the implementation constitute a basis of a general scientific tool suitable to investigate further open questions of membrane-electrolyte dynamics.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dér Andrásnak, aki megszámlálhatatlan alkalommal segített nekem mind a tudományos, mind az élet más területein jelentkező problémák megoldásában. Szeretném megköszönni neki a sok időt és gondolatot, amelyet megosztott velem az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom Tóth-Boconádi Rudolfnak a bakteriorodopszin mintán végzett fotoelektromos mérésekben nyújtott közreműködéséért, Kulcsár Ágnesnek és Zimányi Lászlónak az abszorpciókinetikai mérések kivitelezéséért és az adatok kiértékeléséért.

Köszönetemet fejezem ki Keszthelyi Lajosnak a megtisztelő támogatásért, figyelemért és a gondolatébresztő beszélgetésekért.

Köszönetet mondok Ormos Pálnak, akinek támogatása, kritikai észrevételei, látásmódja nagyon sokat jelentett és jelent számomra.

Külön helyen szeretném megköszönni Ormos Pálnak és Dér Andrásnak az értekezés kritikus tanulmányozását.

A fotoelektromos mérésekhez használt magas színvonalú házi műszerek és eszközök elkészítéséért Gárgyán Józsefet, Imre Zoltánt, Szűcs Miklóst, a bakteriorodopszin minták előkészítésében nyújtott segítségéért Kissné Domonkos Máriát illeti köszönet.

Hálás vagyok továbbá az intézet dolgozóinak azért a csodálatra méltó, kellemes légkörért, amelyet maguk körül teremtettek, és amelyben jó volt dolgozni.

Végül szeretném megköszönni családomnak, szüleimnek, nagyszüleimnek a türelmet, támogatást és szeretetet, amelyre mindig számíhattam, és amely nagyon jól esett.

Irodalomjegyzék

- Andrew R L (2001) *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Addison Wesley Longman, Essex, UK
- Bamberg E, Dencher N A, Fahr A, Heyn M P (1981) Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7502-7506
- Barabás K, Dér A, Dancsházy Zs, Ormos P, Keszthelyi L, Marden M (1983) Electro-optical measurements on aqueous suspension of purple membrane from *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 43: 5-11
- Birge R R, Gillespie N B; Izaguirre E W, Kusnetzow A, Lawrence A F, Singh D, Song Q W, Schmidt E, Stuart J A, Seetharaman S, Wise K J (1999) Biomolecular electronics: Protein-based associative processors and volumetric memories. *J. Phys. Chem. B.* 103: 10746-10766
- Chung S H, Hoyles M, Allen T, Kuyucak S (1998) Study of ionic currents across a model membrane channel using Brownian dynamics. *Biophys. J.* 75: 793- 809
- Corry B, Kuyucak S, Chung S H (2000) Tests of continuum theories as models of ion channels. II. Poisson-Nernst-Planck Theory versus Brownian dynamics. *Biophys. J.* 78: 2364-2381
- Dancsházy Z, Karvaly B (1976) Incorporation of bacteriorhodopsin into a bilayer lipid membrane: a photoelectric-spectroscopic study. *FEBS. Lett.* 72: 136-138
- Debye P, Hückel E (1923) Zur Theorie der Elektrolyte. *Physik. Zeitschr.* 24: 185-206
- Dér A, Fendler K, Keszthelyi L, Bamberg E (1985a) Primary charge separation in halorhodopsin. *FEBS. Lett.* 187: 233-236
- Dér A, Hargittai P, Simon J (1985b) Time-resolved photoelectric and absorption signals from oriented purple membranes immobilized in gel. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10(5-6): 295-300
- Dér A, Tóth-Boconádi R, Keszthelyi L (1989) Bacteriorhodopsin as a possible chloride pump. *FEBS. Lett.* 259: 24-2
- Dér A, Száraz S, Tóth-Boconádi R, Tokaji Zs, Keszthelyi L, Stoeckenius W (1991) Alternative translocation of protons and halide ions by bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4751-4755
- Dér A, Száraz S, Keszthelyi L (1992a) Charge displacements during the photocycle of halorhodopsin. *J. Photochem. Photobiol. B.* 15: 299-306

- Dér A, Tóth-Boconádi R, Száraz S (1992b) Electric signals and the photocycle of bacteriorhodopsin. *Colloque Inserm* 221: 197-200
- Dér A, Tóth-Boconádi R, Keszthelyi L, Kramer H, Stoeckenius W (1995a) Orientation of purple membrane in combined electric and magnetic fields. *FEBS. Lett.* 377: 419-420
- Dér A, Ormos P (1995b) Introduction of a method for three-dimensional mapping of the charge motion in bacteriorhodopsin. *Biophys. Chem.* 56: 159-163
- Dér A, Oroszi L, Kulcsár A, Zimányi L, Tóth-Boconádi R, Keszthelyi L, Stoeckenius W, Ormos P (1999) Interpretation of the spatial charge displacements in bacteriorhodopsin in terms of structural changes during the photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2776-2781
- Dancsházy Z, Karvaly B (1976) Incorporation of bacteriorhodopsin into a bilayer lipid membrane; a photoelectric-spectroscopic study. *FEBS. Lett.* 72: 136-138
- Drachev L A, Kaulen A D, Ostroumov S A, Skulachev V P (1974) Electrogenesis by bacteriorhodopsin incorporated in a planar phospholipid membrane. *FEBS. Lett.* 39: 43-45
- Ebrey T G (1993) in *Thermodynamics of Membranes, Receptors and Channels*, ed. Jackson, M. (CRC Press, Boca Raton, FL) 353-387
- Engels M, Gerwert K, Bashford D (1995) Computational studies on early intermediates of bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. Chem.* 56: 95-104
- Ermak D L (1975) A computer simulation of charged particles in solution. I. Technique and equilibrium properties. *J. Chem. Phys.* 62: 4162-4196
- Fahr A, Läger P, Bamberg E (1981) Photocurrent kinetics of purple-membrane sheets bound to planar bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 60: 51-62
- Fowler C F, Kok B (1974) Direct Observation of a light-induced electric field in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 357: 308-318
- Frense D, Nacke Th, Stöber H, Beckmann D, Application of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin for the Detection of Environmental Pollutants. Institut für Bioprozeß- und Analysenmeßtechnik e.V., Rosenhof, D-37308 Heilbad Heiligenstadt, Germany. <http://www.chemie.uni-marburg.de/~nanobio1/Frense.html>
- Gergely C, Ganea C, Groma G, Váró G (1993) Study of the photocycle and charge motions of the bacteriorhodopsin mutant D96N. *Biophys. J.* 65: 2478-2483
- Gergely C, Zimányi L, Váró G (1997) Bacteriorhodopsin intermediate spectra determined over a wide pH range. *J. Phys. Chem. B.* 101: 9390-9395

- Govorunova E, Dér A, Tóth-Boconádi R, Keszthelyi L (1995) Photosynthetic charge separation in oriented membrane fragments immobilized in gel. *Bioelectrochem. Bioeng.* 38: 53-56
- Grigorieff N, Ceska T A, Downing K H, Baldwin J M, Henderson R (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 259: 393-421
- Hampp N, Bräuchle C, Oesterhelt D (1990) Bacteriorhodopsin wildtype and variant aspartate-96-asparagine as reversible holographic media. *Biophys. J.* 58: 83-93
- Haupts U, Tittor J, Oesterhelt D (1999) Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 367-399
- Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A, Zemlin F, Beckmann E, Downing K H (1990) An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 844-844
- Herrmann T R, Rayfield G W (1978) The electrical response to light of bacteriorhodopsin in planar membranes. *Biophys. J.* 21: 111-125
- Hong F T, Montal M (1979) Bacteriorhodopsin in model membranes. A new component of the displacement photocurrent in the microsecond time scale. *Biophys. J.* 25: 465-472
- Humphrey W, Xu D, Sheves M, Schulten K (1995) Molecular dynamics study of the early intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Phys. Chem.* 99: 14549-14560
- Im W, Seefeld S, Roux B (2000) A grand canonical Monte Carlo - Brownian dynamics algorithm for simulating ion channels. *Biophys. J.* 79: 788-801
- Jakobsson E, Chiu S W (1987) Stochastic theory of ion movement in channels with single-ion occupancy. Application to sodium permeation of gramicidin channels. *Biophys. J.* 52: 33- 45
- Joseph J, Aranda F J, Rao D, Akkara J A, Nakashima M (1996) Optical Fourier processing using photoinduced dichroism in a bacteriorhodopsin film. *Opt. Lett.* 21: 1499-1501
- Keszthelyi L (1980) Orientation of membrane fragments by electric field. *Biochim. Biophys. Acta* 598: 429-436
- Keszthelyi L, Ormos P (1980) Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 109: 189-193
- Keszthelyi L, Ormos P (1989) Protein electric response signals from dielectrically polarized systems. *J. Membr. Biol.* 109: 193-200

- Kimura Y, Vassilyev D G, Miyazawa A, Kidera A, Matsushima M, Mitsuoka K, Murata K, Hirai T, Fujuyoshi Y (1997) Surface of Bacteriorhodopsin Revealed by High-Resolution Electron Crystallography. *Nature* 389: 206-210
- Lanyi J K (1993) Proton Translocation Mechanism and Energetics in the Light-driven Pump Bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics Reviews* 1183: 241-261
- Lanyi J K (1999) Bacteriorhodopsin. *International Review of Cytology* 187: 161-202
- Lanyi J K, Luecke H (2001) Bacteriorhodopsin. *Current Opinion in Structural Biology*. 11: 415-419
- Lauger P, Apell H (1982) Jumping frequencies in membrane channels: comparison between stochastic, molecular dynamics and rate theory. *Biophys. Chem.* 16: 209
- Li S C, Hoyles M, Kuyucak S, Chung S H (1998) Brownian dynamics study of ion transport in the vestibule of membrane channels. *Biophys. J.* 74: 37-47
- Liu S Y (1990) Light-induced currents from oriented purple membrane. I. Correlation of the microsecond component (B2) with the L- M photocycle transition. *Biophys. J.* 57: 943-950
- Liu S Y, Ebrey T G (1988) Photocurrent measurements of the purple membrane oriented in a polyacrylamide gel. *Biophys. J.* 54: 321-329
- Liu S Y, Govindjee R, Ebrey T G (1990) Light-induced currents from oriented purple membrane. II. Proton and cation contributions to the photocurrent. *Biophys. J.* 57: 951-963
- Lozier R H, Bogomolni R A, Stoerkenius W (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 15: 955-962
- Ludmann K, Gergely C, Dér A, Váró G (1998) Electric signals during the bacteriorhodopsin photocycle, determined over a wide pH range. *Biophys. J.* 75: 3120-3126
- Ludmann K, Ibrón G, Lanyi J K, Varó G (2000) Charge motions during the photocycle of pharaonis halorhodopsin. *Biophys. J.* 78: 959-966
- Luecke H, Richter H T, Lanyi J K (1998) Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science* 280: 1934-1937
- Madura J D, Briggs J M, Wade R C, Davis M E, Luty B A, Ilin A, Antosiewicz J, Gilson M K, Bagheri B, Scott L R, Mccammon J A (1995) Electrostatics and diffusion of molecules in solution - simulations with the University of Houston Brownian Dynamics program. *Comput. Phys. Commun.* 91: 57-95
- Maret G, Weill G (1983) Magnetic birefringence study of the electrostatic and intrinsic persistence length of DNA. *Biopolymers* 22: 2727-2744

- Marinetti T (1987) Counterion collapse and the effect of diamines on bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 216: 155-158
- Miyasaka T, Koyama K (1993) Image sensing and processing by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor. *Appl. Opt.* 32: 6371-6379
- Moy G, Corry B, Kuyucak S, Chung S H (2000) Tests of continuum theories as models of ion channels. I. Poisson-Boltzmann theory versus Brownian dynamics. *Biophys. J.* 78: 2349-2363
- Müller K H, Butt H J, Bamberg E, Fendler K, Hess B, Siebert F, Engelhard M (1991) The reaction cycle of bacteriorhodopsin: an analysis using visible absorption, photocurrent and infrared techniques. *Eur. Biophys. J.* 19: 241-251
- Nagle J F (1991) Solving complex photocycle kinetics. Theory and direct method. *Biophys. J.* 54: 476-487
- Oesterhelt D, Stoeckenius W (1974) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol.* 31: 667-678
- Okada-Shudo Y, Yamaguchi Y I, Tomioka H, Sasabe H (1996) Real-time image processing using polarization discrimination of bacteriorhodopsin. *Synth. Met.* 81: 147-149
- Ormos P, Dér A, Száraz S, Tokaji, Zs, Zimányi L, Nagy K (1996) Photoreactions and related charge displacements in the rhodopsin from *Sepia officinalis*. *J. Photochem. PhotoBiol. B.* 35: 7-12
- Oroszi L, Dér A, Ormos P (2002) Theory of electric signals of membrane proteins in three dimensions. *Eur. Biophys. J.* 31: 136-144
- Oroszi L, Dér A, Wolff E, Hasemann O (2003) Modeling of ionic relaxation around a biomembrane disk. *Bioelectrochemistry* 60: 97-106
- Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch J P, Landau E M (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277: 1676-1681
- Roux B (1998) Molecular dynamics simulations of ion channels: how far have we gone and where are we heading? *Biophys. J.* 74: 2744 -2745
- Sass H, Büldt G, Gessenich G, Hehn D, Schlezinger R, Berendzen J, Ormos P (2000) Essential structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature* 406: 649-653
- Scharnagl C, Hettkenkofer J, Fischer S F (1994) Proton release pathway in bacteriorhodopsin: molecular dynamics and electrostatic calculations. *Int. J. Quantum Chem.* 21: 33-56

- Schirmer T, Phale P (1999) Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *J. Mol. Biol.* 294: 1159-1168
- Schulten K és mt. (2003) Theoretical and Computational Biophysics Group. Beckman Institute. University of Illinois at Urbana Champaign. <http://www.ks.uiuc.edu>
- Sineshchekov O A, Govorunova E G, Dér A, Keszthelyi L, Nultsch W (1992) Photoelectric responses in phototactic flagellated algae measured in cell suspension. *J. Photochem. PhotoBiol. B.* 13: 119-134
- Skulachev V P (1979) Membrane potential and reconstitution. *Methods Enzymol.* 55: 586-603
- Tóth-Boconádi R, Dér A, Keszthelyi L (2000) Buffer effects on electric signals of light-excited bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 78: 3170-3177
- Trissl H W (1990) Photoelectric measurements of purple membranes. *Photochem. Photobiol.* 51: 793-818
- Trissl H W, Kunze U, Junge W (1982) Extremely fast photoelectric signals from suspension of broken chloroplasts and of isolated chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* 682: 364-377
- van Gunsteren W F, Berendsen H J C (1982) Algorithms for Brownian dynamics. *Mol. Phys.* 45: 637-647
- Váró G (1981) Dried oriented purple membrane samples. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 32: 301-310
- Váró G, Keszthelyi L (1983) Photoelectric signals from dried oriented purple membranes of *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 43: 47-51
- Wade R C, Luty B A, Demchuk E, Madura J D, Davis M E, Briggs J M, McCammon J A (1994) Simulation of enzyme-substrate encounter with gated active sites. *Nat. Struct. Biol.* 1: 65-69
- Witt H T, Zickler A (1973) Electrical evidence for the field indicating absorption change in bioenergetic membranes. *FEBS Lett.* 37: 307-310
- Xu D, Sheves M, Schulten K (1995) Molecular dynamics study of the M412 intermediate of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 69: 2745-2760
- Zimányi L, Lanyi J K (1993) Deriving the intermediate spectra and photocycle kinetics from time-resolved difference spectra of bacteriorhodopsin. The simpler case of the recombinant D96N protein. *Biophys. J.* 64: 240-251